

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**Interacción célula sinovial-fibrina como
mecanismo patogénico y oportunidad
terapéutica en artritis reumatoide**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Antonio Gabucio López

DIRECTORA

Olga Sánchez Pernaute

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Universidad Complutense de Madrid

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Interacción célula sinovial-fibrina como
mecanismo patogénico y oportunidad
terapéutica en artritis reumatoide**

PRESENTADA POR

Antonio Gabucio López

Directora

Olga Sánchez Pernaute

***A todos los que me han ayudado
por hacer la vida más fácil
y a todos los que me han “des”-ayudado
por enseñarme a ser más fuerte***

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Olga Sánchez Pernaute, directora del estudio, por su incansable apoyo y asesoramiento científico.

Al doctor Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca, jefe de servicio de reumatología de la Fundación Jiménez Díaz, por su insustituible apoyo y sin el cual, esta tesis no hubiera sido posible.

A los pacientes anónimos, objeto y objetivo del estudio, sin cuya existencia y solidaridad nada de esto tendría sentido.

A la Sociedad Española de Reumatología, por el apoyo prestado en el origen de este proyecto.

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz por su soporte financiero.

A todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido al desarrollo de esta tesis doctoral.

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Relevancia clínica e impacto de la artritis reumatoide.....	9
1.1. Epidemiología.....	9
1.2. Repercusión socioeconómica.....	10
1.3. Etiopatogenia.....	10
1.4. Autoinmunidad.....	12
1.5. Clínica y tratamiento.....	12
2. La sinovitis reumatoide.....	15
2.1. Histología de la membrana sinovial normal.....	15
2.2. Cambios que se producen en el tejido durante la enfermedad.....	16
3. Fisiopatología de la AR.....	20
3.1. Mecanismos inductores.....	20
3.2. Mecanismos de perpetuación.....	21
3.3. Mecanismos de progresión.....	23
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Obtención y manejo de tejidos.....	33
1.1. Población del estudio.	33
1.2. Cultivos celulares.....	33
1.3. Muestras histológicas.....	34
2. Diseño experimental.....	34
2.1. Polimerización in situ de fibrina.....	34
2.2. Citrulinación de fibrina y fibrinógeno.....	35
2.3. Experimentos de bloqueo.....	36
2.4. Experimentos de silenciamiento (siARN).....	36
2.5. Ensayos de viabilidad celular.....	37
2.6. Controles para descartar contaminación mediada por lipopolisacáridos.....	37
3. Análisis proteicos.	37
3.1. Inmunohistoquímica.....	37
3.2. Estudios de inmunofluorescencia.....	38
3.3. Homogenización de fibrina para estudios de proteínas.....	38

3.4. Western blot/inmunoblot e inmunoprecipitación.....	39
3.5. Medida de liberación de citoquinas.....	39
3.6. Confirmación de la eficiencia de la citrulinación.....	39
4. Análisis de ácidos nucleicos.....	40
4.1. Extracción de ARN.....	40
4.2. Retrotranscripción.....	40
4.3. PCR cuantitativa.....	40
4.4. Microarray de expresión génica.....	41
4.5. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA).....	42
5. Obtención y análisis de datos.....	42
RESULTADOS.....	45
1. La fibrina es un estímulo proinflamatorio para los fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide.....	47
1.1. Estudio del transcriptoma inducido por fibrina en cultivos de FSAR.....	47
1.2. La fibrina induce la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL8 e IL6 en los FSAR.....	48
1.3. La fibrina induce la expresión de ciclooxigenasa 2 por los FSAR.....	51
1.4. Confirmación de la inducción de otros genes proinflamatorios y moléculas reguladoras por fibrina en FSAR mediante estudios de qPCR.....	54
1.5. Resumen sección 1.....	57
2. La fibrina activa al factor de transcripción NFκB a través de los receptores TLR4 en los FSAR.....	57
2.1. Activación de NFκB en FSAR incubados con fibrina.....	57
2.2. La incubación con fibrina produce una activación de las quinasa intracelulares activadas por mitógeno en FSAR.....	60
2.3. Estudio de los receptores putativos de fibrina en FSAR, mediante silenciamiento postranscripcional con sondas siRNA.....	61
2.4. Estudios para descartar contaminación por lipopolisacárido.....	65
2.5. Resumen sección 2.....	65
3. La citrulinación aumenta el efecto de la fibrina sobre la expresión y síntesis de las citoquinas proinflamatorias.....	66
3.1. Eficiencia de la citrulinación de la fibrina con las peptidilarginín deiminasa (PAD) 2 y 4.....	66
3.2. Ensayo de viabilidad celular en FSAR incubados con fibrina citrulinada.....	67
3.3. Expresión génica de IL8 e IL6 en FSAR incubados con fibrina citrulinada en comparación con fibrina nativa.....	68

3.4. Niveles de IL8 e IL6 en los sobrenadantes de FSAR incubados con fibrina citrulinada en comparación con fibrina nativa.....	69
3.5. Estudios para descartar contaminación por lipopolisacárido del medio y las enzimas citrulinantes.....	69
3.6. Resumen sección 3.....	70
4. Papel de la fibrina como estímulo proinvasivo para los fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide.....	70
4.1. Confirmación de la inducción por fibrina de moléculas asociadas al fenotipo invasivo de los FSAR.....	71
4.2. Colocalización de MMP1 y MMP3 con fibrina en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide.....	71
4.3. Expresión génica de las metaloproteinasas MMP1, MMP3, MMP9, MMP13 y MMP14 en FSAR incubados con fibrina.....	73
4.4. Detección proteica de MMP1 y MMP3 en sus formas latente y activa tras incubación de los FSAR con fibrina.....	73
4.5. Resumen sección 4.....	74
5. Comparación en la respuesta celular a la fibrina entre pacientes con artritis reumatoide y artrosis.....	74
5.1. Comparación de la inducción de moléculas proinflamatorias por la fibrina en FSAR y FSOA.....	75
5.2. Comparación de la inducción de moléculas reguladoras por la fibrina en FSAR y FSOA.....	80
5.3. Comparación del efecto de la fibrina sobre la inducción de IL8 e IL6 tras silenciar TLR4 en FSAR y FSOA.....	80
5.4. Comparación del efecto de la inducción de moléculas asociadas al fenotipo invasivo por la fibrina en FSAR y FSOA.....	81
5.5. Resumen sección 5.....	82
DISCUSIÓN.....	83
1. Efecto inducido por fibrina en células sinoviales reumatoides.....	85
2. Identificación del receptor de la fibrina en los fibroblastos sinoviales reumatoides.....	90
3. La citrulinación de fibrina en el efecto inducido en células sinoviales reumatoides.....	95
4. Asociación entre los depósitos de fibrina e invasividad en fibroblastos sinoviales y en la membrana sinovial reumatoide.....	96
5. Especificidad patológica del efecto de la fibrina en los fibroblastos sinoviales.....	97
6. Diferentes dianas terapéuticas enfocadas especialmente en los primeros eventos patológicos de la enfermedad.....	98
7. Principales limitaciones del estudio.....	102

CONCLUSIONES.....	105
BIBLIOGRAFÍA.....	109
ANEXO 1.....	127
A1.1. Relación de secuencias modificadas por el efecto de la fibrina en RASF.....	129
A1.2. TABLA DE GENES SOBREENPRESADOS.....	130
A1.3. TABLA DE GENES INHIBIDOS.....	133
A1.4. BIBLIOGRAFÍA.....	137
ANEXO 2.....	139
A2.1. Curva de tiempo de silenciamientos.....	141
A2.1.1. Curva de tiempo de silenciamiento de TLR2.....	141
A2.1.2. Curva de tiempo de silenciamiento de TLR4.....	141
A2.1.3. Curva de tiempo de silenciamiento de ICAM-1.....	142
A2.2. Eficiencia de los silenciamientos.....	143
A2.2.1. Eficiencia del silenciamiento de TLR4.....	143
A2.2.2. Eficiencia del silenciamiento de TLR2.....	143
A2.2.3. Eficiencia del silenciamiento de ICAM-1.....	144
A2.3. Activación de la quinasa intracelular activada por mitógeno.....	146
A2.3.1. Activación de la quinasa intracelular activada por mitógeno ERK42/44 en FSOA.....	146
A2.3.2. Activación de la quinasa intracelular activada por mitógeno JNK46/54 en FSOA.....	147
ANEXO 3.....	149
A.3.1. Citrullination Enhances The Pro-Inflammatory Response To Fibrin In Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts.....	151
A.3.2. Innate Mechanism of Sinovitis- Fibrin Deposits Contribute to Invasión.....	181
A.3.3. Targets Hidden by Fibrin Networks Still Need to Find Their Place in the Armamentum for Rheumatoid Arthritis.....	195

Abreviatura o acrónimo	Significado
®	Fosfo-, isoforma fosforilada
A20	Proteína 3 inducida por TNFα
Ac	Anticuerpo
ACPA	Anticuerpos frente a péptidos citrulinados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Artritis inducida por antígeno
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AKT	Proteína quinasa B alfa
AKT1S1	Sustrato 1 de AKT1
AP1	Proteína activadora 1
APC	Célula presentadora de antígenos
AR	Artritis reumatoide
ARHGEF	Factor de intercambio nucleotídico guanina rho
ARHGEF10L	Péptido 10 similar al factor de intercambio nucleotídico guanina rho
ARN	Ácido ribonucleico
BDKRB1	Receptor B1 de la bradiquinina
BIRC3	Péptido 3 con repetición baculoviral
BSA	Albúmina sérica bovina
CAIA	Artritis inducida por antígenos de colágeno
CBP	Carboxipeptidasa B
CCL	Quimioquinas con motivo CC
CD	Clúster de diferenciación
CDC42EP	Proteína efectora (de unión a GTPasa Rho) CDC42
CIA	Artritis inducida por colágeno
COX	Ciclooxigenasa
CREB	Factor de transcripción de respuesta al AMPc
CTLA	Antígeno de linfocitos T citotóxicos
CXCL	Quimioquina con motivo CXC
CYR61	Inductor angiogénico 61, con regiones Cys-rich
DAMP	Marcador de daño tisular o trauma
DAPP	Adaptador dual de fosfotirosina y 3 fosfoinosítidos
DENN/MADD	Dominio de muerte diferencialmente expresado en células neoplásicas y normales, activado vía MAPK
DIRAS3	Péptido similar a RAS 3
DMEM	Medio Dulbecco Modified Eagle
DTT	Ditiotriol
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGR1	Factor de crecimiento de respuesta temprana 1
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética
End1	Endotelina 1

Abreviatura o acrónimo	Significado
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FAME	Fármacos modificadores de la enfermedad
Fc	Fracción cristizable de los anticuerpos
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
Fib	Fibrina
fibrina-citP2	Fibrina citrulinada con la enzima PAD2
fibrina-citP4	Fibrina citrulinada con la enzima PAD4
fibrina-sham	Fibrina nativa
FR	Factor reumatoide
FS	Fibroblastos sinoviales
FSAR	Fibroblastos sinoviales reumatoides
FSOA	Fibroblastos sinoviales artrósicos
FVIIai	Bloqueador del sitio activo del factor VII
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GCH1	GTP Ciclohrolasa 1
GIR	Genes inducibles por ácido retinoico
gp130	Glicoproteína 130
HDAC	Histona deacetilasa
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)-piperacín-N'-(2-etano-sulfónico)
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSPB	Proteína de choque térmico
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN	Interferón
IKK	Quinasa inhibidora del factor nuclear κ B
IL	Interleucina
IL17R1	Receptor 1 de la interleucina 17
IP10	Proteína inducida por interferón gamma 10
IRAK	Quinasa asociada al receptor de IL1
IκB	Inhibidor del factor nuclear κ B
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolisacárido
Mal	Proteína Mal de diferenciación de células T
ME	Mercaptoetanol
MEC	Matriz extracelular
MEOX1	Homeobox 1 mesenquimal
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
miARN	micro ARN
MKK	MAP quinasa
MMP	Metaloproteinasa de matriz
Mock	Secuencia no codificante

Abreviatura o acrónimo	Significado
MyD	Gen de la respuesta primaria de diferenciación mieloide
NEDD9	Molécula 9 de los precursores neurales inhibida en el desarrollo
NFκB	Factor nuclear kappa B
NLR	Receptores tipo NOD
NRT	Reacción de control negativo
ns	No significativo
NTF3	Neurotrofina 3
PAD	Enzima citrulinante peptidil arginín deiminasa/ Peptidyl-arginine deiminases
PADI-4	Secuencia codificante de la enzima citrulinante peptidil arginín Deiminasa 4
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAR	Receptor activado por proteasas
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PI4K2A	Fosfatidilinositol 4-quinasa Tipo 2 Alfa
PITPNB	Proteína fosfatidilinositol transferasa beta
Plg	Plasminógeno
PLK2	Quinasa 2 tipo polo
PMAIP1	Proteína 1 inducida por forbol 12 miristato 13 acetato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PMX	Polimixina
PTM	Modificaciones postraduccionales
PTPN	Proteín tirosín fosfatasa no receptora
qPCR	PCR cuantitativa
RA	Rheumatoid arthritis
RADIL	Péptido asociado a Ras con dominios DIL
RANK-L	Ligando de receptor activador para el factor nuclear κB
RAPH1	Péptido asociado a Ras con dominios homólogos a plectrina
RelA	Factor de transcripción p65
RGS4	Regulador 4 de la señalización de proteínas G
RHOB	Homólogo B de la familia Ras
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
SCID	Modelo de inmunodeficiencia combinada grave
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis mediante gel de poliacrilamida con SDS
SE	Epítipo compartido

Abreviatura o acrónimo	Significado
siARN	ARN de silenciamiento
siICAM	Células tratadas con ICAM-1 siARN
siMock	Células tratadas con Mock siARN
siTLR2	Células tratadas con TLR2 siARN
siTLR4	Células tratadas con TLR4 siARN
SOCS	Supresor de la señalización de citoquinas
SOD	Superóxido dismutasa
SP1	Factor de transcripción Especificidad 1
SRGAP1	Proteína activadora de GTPasa Rho SLIT-ROBO 1
STF	Suero de ternera fetal
SYDE2	Homólogo 2 de GTPasas Rho, defectivo en sinapsis 1
Synj	Sinaptojanina
TA	Temperatura ambiente
TAK1	Quinasa 1 activada por factor de crecimiento transformante beta
TBK	Quinasa de TANK
TBS	Tampón tris salino
TF	Factor tisular
TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular
Th	Células T colaboradoras
THBD	Trombomodulina
THBS1	Trombospondina 1
TIR	Receptor Toll-interleucina 1
TLR	Receptores tipo toll
TNFAIP	Proteína inducible por TNFalfa
TNFSF	Ligando de la superfamilia de TNF
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
t-PA	Activador del plasminógeno tisular
T-PS	Profármaco fotosensibilizante polimérico sensible a la trombina
TRAF	Factor asociado al receptor del TNF
TRAM	Proteína de translocación asociada a membrana
Treg	Células T reguladoras
TRIF	Dominio TIR con adaptador inductor de IFNβ
Tub	Tubulina
ub	Ubiquitina
UDPGD	Uridín difosfoglucosa deshidrogenasa
UI	Unidades internacionales
uPA	Activador de plasminógeno tipo uroquinasa
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
vW	Factor de Von Willebrand
WB	Western blot

Abreviatura o acrónimo	Significado
wl	Enlace web
ZC3H12A	Péptido 12 A tipo Zn-finger CCCH

RESUMEN

ABSTRACT

RESUMEN / ABSTRACT

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica, progresiva e invalidante, mediada por mecanismos inmunes, que afecta al uno por ciento de la población mundial adulta. El tratamiento de la artritis reumatoide ha sufrido una revolución en las últimas dos décadas con la llegada de los agentes biológicos, diseñados a partir del mejor conocimiento de los mecanismos patológicos de la enfermedad. Sin embargo, éstos aún muestran una eficacia limitada, tanto en la prevención del daño articular como en el porcentaje de pacientes respondedores. Esta situación es el reflejo de la compleja y heterogénea patogénesis de la enfermedad. Por este motivo es necesaria una continua búsqueda de nuevas estrategias.

La deposición de fibrina intraarticular en la enfermedad es un proceso aún poco explotado en la búsqueda de tratamientos. En base a los estudios existentes, se puede considerar que la deposición de fibrina ocurre en fases tempranas de la cascada patogénica y tiene un papel en el desarrollo de la sinovitis. Por ello, este proceso constituye una diana ideal en el desarrollo de nuevas terapias.

El objetivo del presente trabajo consistió en describir el proceso y los mecanismos de activación desencadenados por la fibrina en las articulaciones y su contribución al desarrollo y progresión de la AR, con la finalidad de identificar posibles dianas terapéuticas dirigidas a estos mecanismos.

La interacción entre la fibrina y los fibroblastos sinoviales se estudió *in vitro* en ausencia de componentes del sistema inmune celular. Para ello se desarrolló un método de polimerización *in situ* de fibrina en cultivos de fibroblastos sinoviales artríticos donde el fibrinógeno se inmovilizó mediante la adición de trombina directamente sobre los cultivos celulares. Una vez optimizado este sistema, se realizó un estudio del transcriptoma inducido por fibrina en estos cultivos mediante técnicas de chip array de genoma completo. Posteriormente se confirmó la inducción de diferentes moléculas en nuevos cultivos celulares, mediante PCR cuantitativa (expresión de ARN) y Western blot ó enzimoimmunoanálisis (niveles proteicos). Una vez confirmada su estimulación por fibrina se procedió a descifrar la ruta de activación mediada por fibrina en los fibroblastos sinoviales. Con este fin se emplearon técnicas de bloqueo y de silenciamiento génico en el sistema de polimerización *in situ*. Además, se optimizó un sistema de citrulinación *in vitro* de fibrina con el fin de estudiar el efecto de esta modificación molecular que ocurre *in vivo* en las articulaciones de los pacientes, sobre la inducción génica mediada por la fibrina. De forma paralela,

mediante estudios de inmunohistoquímica se confirmó la relación de los depósitos intraarticulares de fibrina con el fenotipo agresivo de los fibroblastos sinoviales artríticos. Por último, se estudió si los mecanismos observados podrían ser específicos de la artritis reumatoide, mediante comparación con cultivos de fibroblastos sinoviales artrósicos.

Los resultados del presente estudio mostraron que la fibrina ejerce una estimulación de los fibroblastos sinoviales a través de la activación del factor nuclear κ B, mediada por el receptor toll-like (TLR) 4. Esta activación celular lleva a la producción de las principales citoquinas, quimioattractantes, moléculas de adhesión y proteasas asociadas a la sinovitis reumatoide en ausencia de intervención del sistema inmune. Esta activación se vio incrementada por la citrulinación de la fibrina. Por otra parte, aunque esta ruta de activación no fue específica de los fibroblastos sinoviales artríticos, podría estar magnificada en estas células respecto a sus equivalentes artrósicos, fundamentalmente debido a la situación de trombofilia extraarticular existente en la artritis reumatoide y a la sobreexpresión del receptor TLR4 en las articulaciones reumatoideas. Globalmente, estos estudios sugieren el sistema de la hemostasia/fibrinólisis, las enzimas peptidil arginín deiminadas y el bloqueo de TLR4, como posibles dianas de esta ruta patogénica para el diseño de estrategias terapéuticas en la artritis reumatoide. Se discuten las posibilidades y las limitaciones de la aplicación de estos hallazgos en la práctica clínica.

Rheumatoid arthritis (RA) is an invalidating, progressive and chronic inflammatory illness mediated by immune mechanisms, affecting around one percent of the adult population around the world. Its treatment has undergone a huge revolution in the past two decades with the incoming of biological therapies, which have been developed as a result of a better understanding of RA pathogenesis. However, these new drugs display a limited efficacy, both at slowing down joint damage and in number of responders. This reflects the complexity of the disease, as well as its heterogeneous pathogenesis. In consequence, there is a continuous need for searching new therapeutic strategies.

The intra-articular fibrin deposition in RA is currently a yet little-explored process in the development of anti rheumatoid compounds. In the light of previous studies, fibrin deposition inside joints could take place at the earliest phases of the pathogenic sequence, and participate in the generation of synovitis. Considering these facts, fibrin clotting could account for an attractive targetable process in RA. The objective in this work was to describe the process of activation triggered by fibrin in rheumatoid joints, and its contribution to disease progression, aiming at identifying targetable checkpoints of potential clinical use.

In this work, the interaction between fibrin and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts was studied *in vitro* in the absence of immune cell cooperation. To this purpose, an *in situ* polymerization fibrin clotting method was developed, in which fibrinogen was immobilized with the addition of thrombin directly on top of cell monolayer. Once optimized, the culture system was employed in a transcriptomic whole genome expression assay detecting fibrin-inducible genes by chip array techniques. The stimulation of specific genes was thereafter confirmed in new cell cultures by quantitative PCR (RNA expression), and Western blot or enzyme immunoassays (protein levels). Once the induction of key molecules by fibrin was confirmed, we conducted blocking experiments as well as gene silencing techniques intended to delineate the fibrin-dependent signaling pathway in these cells. In addition, an *in vitro* citrullinated fibrin polymerization model followed by cell stimulation was developed in order to approach the effect of this *in vivo*-occurring modification on fibrin-mediated cell activation. In parallel, immunostaining techniques were performed to assess the relationship between intra-articular fibrin and aggressive features of synovitis in synovial explants from patients with RA. Finally, to assess the specificity of fibrin actions on rheumatoid synovial fibroblasts some experiments were conducted in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis.

On the whole, our results describe fibrin ability to stimulate synovial fibroblasts, triggering a nuclear factor kappa B-dependent pathway through the binding of toll-like receptor (TLR) 4. This activation leads to the production of some of the major cytokines, chemokines, adhesion molecules, and proteases associated to rheumatoid synovitis. Moreover, this effect was found in the absence of immune cells.

This process was increased upon fibrin citrullination. On the other hand, albeit the stimulation was found to be non-specific for RA synovial fibroblasts, our results suggest that the process could be magnified in rheumatoid cells, as compared to their osteoarthritic equivalents, particularly as a result of a pro-thrombotic extravascular status in rheumatoid joints, and because of the up-regulation of TLR4 in these cells. Globally, our study points to the clotting/fibrinolysis systems, the family of peptidyl-arginine deiminases (PAD) and TLR4 as potential targets in this pathogenic route to consider in the design of new therapeutic compounds. Both the expected benefit and limitations hampering the clinical application of these findings are amply discussed.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Relevancia clínica e impacto de la artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica, progresiva e invalidante, mediada por mecanismos inmunes, que afecta a las articulaciones diartrodiales. Con frecuencia se producen también manifestaciones extraarticulares. Aunque en la mayoría de los casos no se asocia con un evento desencadenante, actualmente se reconocen diversos factores etiopatogénicos implicados en su desarrollo, incluyendo factores genéticos, hormonales, ambientales y/o tóxicos entre otros. La interacción entre ellos podría intervenir en la aparición de la enfermedad y en su progresión, extensión y patrón de respuesta inflamatoria, hechos que condicionan la heterogeneidad clínica y la respuesta terapéutica (Cajigas Melgoza JC, et al., 2011) (Naranjo Hernández A, 1999).

Este padecimiento se considera una enfermedad catastrófica, en virtud de que llega a condicionar una incapacidad funcional potencialmente progresiva, lo cual trasciende en el ámbito familiar, social y económico de las personas afectadas, dado que requieren más cuidados e ingresos hospitalarios y ven duplicada la tasa de mortalidad respecto a la población general (Cajigas Melgoza JC, et al., 2011).

1.1. Epidemiología

La AR tiene una distribución mundial y afecta al 1% de la población mundial mayor de 18 años, sin apenas diferencias entre los grupos étnicos, a excepción de algunas poblaciones nativas americanas donde la incidencia llega al 5-6%. La enfermedad puede iniciarse a cualquier edad, aunque la incidencia aumenta a lo largo de la vida. Se observa un pico de incidencia en mujeres entre 35 y 45 años, edad en que existe un riesgo 2.5 veces superior en mujeres. Sin embargo, esta relación se iguala en la edad avanzada. En Europa la prevalencia es algo superior en los países nórdicos (0.5-1.1%) respecto a los mediterráneos (0.3-0.7%) (Alamanos Y y Drosos AA, 2005 [w/](#)) y, además, en éstos parece existir una menor incidencia de manifestaciones extraarticulares (AEA) (Carmona L, et al., 2003 [w/](#)).

Se estima que la esperanza de vida de los pacientes con AR está reducida entre 3 y 10 años en relación a la población general (Alamanos Y y Drosos AA, 2005 [w/](#)) (Myasoedova E, et al., 2010 [w/](#)), siendo las principales causas de muerte la enfermedad cardiovascular (Gabriel D, et al., 2012 [w/](#)) (Mikuls TR, 2003 [w/](#)), las

infecciones, el desarrollo de linfomas y los efectos adversos de determinados medicamentos (Mikuls TR, 2003 [w/](#)). La enfermedad también se relaciona con un aumento de la incidencia de fracturas por osteoporosis, lo que incide en su morbimortalidad (Mikuls TR, 2003 [w/](#)).

1.2. Repercusión socioeconómica

Diferentes estudios han mostrado el alto impacto económico de la AR, si bien los resultados varían dependiendo del país donde se estudie, de la evolución clínica y del tratamiento administrado (Catay E, et al., 2012 [w/](#)) (Lajas C, et al., 2003 [w/](#)). En nuestro país, los gastos asociados a la enfermedad están estimados entre 3000€ y los 10000€ anuales por paciente, de los que aproximadamente el 70% suponen gastos directos y un 30% gastos indirectos (Domínguez A, 2003) (Lajas C, et al., 2003 [w/](#)) (Ruiz-Montesinos MD, et al., 2005 [w/](#)). Recientemente, la introducción de terapias biológicas en el manejo de la enfermedad ha supuesto un incremento notable en el gasto farmacéutico derivado de la enfermedad (Domínguez A, 2003) (Mera Varela A, et al., 2003 [w/](#)) (Ruiz-Montesinos MD, et al., 2005 [w/](#)).

Por otra parte, algunos estudios muestran el impacto que tiene la AR en la calidad de vida, respecto a la población de referencia (Staples MP, et al., 2010 [w/](#)) y las diferencias entre pacientes con diferentes grados de gravedad o en tratamiento con medicamentos convencionales respecto a agentes biológicos (Chen JS, et al., 2013 [w/](#)) (Marcos J, et al., 2011 [w/](#)) (Radner H, et al., 2010 [w/](#)) (Staples MP, et al., 2010 [w/](#)).

1.3. Etiopatogenia

La AR es una enfermedad de base poligénica y multifactorial. Se atribuye a factores genéticos hasta el 50-60% del riesgo, siendo la concordancia 4 veces mayor en gemelos monocigotos que en dicigóticos. Los principales genes de susceptibilidad se localizan en el sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA) que codifican el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En particular se observa una frecuencia elevada de alelos de clase II que presentan el denominado epítipo compartido (SE), incluyendo *DR4*, *DR1*, *DR10* y *DR14* (Fauci AS et al., 2008) (MacGregor AJ, et al., 2000 [w/](#)) (Naranjo Hernández A, 1999) (Scott DL, et al., 2010 [w/](#)) (Singal DP, et al., 1999 [w/](#)) (Yamamoto K, 2013 [w/](#)).

Otros genes implicados en la susceptibilidad son los genes codificantes de la proteína tirosín fosfatasa no receptora (*PTPN*)-22 que participa en la activación linfocitaria y de *PADI4*, que codifica la enzima citrulinante peptidil arginín deiminasa

(PAD)-4, en particular en población asiática (Begovich AB, et al., 2004 [w/](#)) (Chang X, et al., 2005b [w/](#)) (Fauci, AS et al., 2008) (Naranjo Hernández A, 1999) (Olivares Martinez E, et al., 2009 [w/](#)) (Suzuki A, et al., 2003 [w/](#)).

Sin embargo, actualmente se considera cada vez más relevante la contribución de los factores ambientales en el desarrollo de la AR. Esta implicación se traduce en gran medida en la aparición de alteraciones epigenéticas (Sanchez-Pernaute O, et al., 2008 [w/](#); 2010 [w/](#)), incluyendo alteraciones en la metilación de ADN y modificaciones postraduccionales (PTM) de las histonas (en particular, metilación, sumonilación o de/acetilación) relacionados con cambios en los patrones constitutivos de expresión génica. Diferentes agentes inductores pueden provocar también cambios en los patrones de silenciamiento molecular mediado por micro ARN (miARN), lo que parece tener relevancia en el desarrollo de la AR. En conjunto, la incidencia de las modificaciones epigenéticas podría contribuir a los cambios de expresión de diferentes mediadores de la enfermedad, tanto en la activación inmunológica como en la transformación de las células sinoviales (Klein K, et al., 2012 [w/](#)).

Los estudios de asociación con distintos factores de riesgo para desarrollar AR resultan ambiguos. El tabaquismo es el factor ambiental cuya relación con la enfermedad está mejor establecida. El tabaco parece asociarse en particular con una mayor incidencia del subtipo de AR con anticuerpos frente a péptidos citrulinados (ACPA) (Quirke AM, et al., 2011 [w/](#)) (Scott DL, et al., 2010 [w/](#)) (Too CL, et al., 2012 [w/](#)).

Los múltiples estudios que han abordado la asociación entre la AR y diferentes microorganismos (Alvarez-Lafuente R, et al., 2005 [w/](#)) (Balandraud N, et al., 2004 [w/](#)) (Ogrendik M, 2013 [w/](#)) (Svartz N, 1975 [w/](#)) (Toussirot E y Roudier J, 2008 [w/](#)) (Us T, et al., 2011 [w/](#)) han sido, por lo general, poco consistentes. Ello, junto a la falta de episodios epidémicos, así como la no transmisión de esta patología en trasplantes de órganos ni transfusiones, descarta la posibilidad de un agente infeccioso como responsable directo de la patología (Thomas R y Lipsky PE, 1996 [w/](#)).

Otros factores débilmente relacionados con el desarrollo de la enfermedad son el alcoholismo, el consumo de café, los niveles de vitamina D, el uso de anticonceptivos orales o el bajo nivel socioeconómico (Scott DL, et al., 2010 [w/](#)).

Actualmente se considera esta enfermedad como un síndrome clínico que abarca muchos subconjuntos de enfermedades, asociadas a diferentes factores (tanto ambientales como genéticos) y desarrollo, existiendo algunos marcadores con un valor pronóstico diferencial entre los distintos subgrupos (Scott DL, et al., 2010 [w/](#)).

1.4. Autoinmunidad

La identificación del factor reumatoide (FR) como autoanticuerpo constituye la primera evidencia de autoinmunidad en la AR. El carácter autoinmune se sustenta por la existencia de muchos otros autoanticuerpos, entre los que destacan los ACPA, que están presentes en un gran porcentaje de pacientes, incluso años antes de la aparición de los primeros síntomas (Rantapaa-Dahlqvist S, et al., 2003 [w/](#)) (Nielen MM, et al., 2004 [w/](#)). En los últimos años se ha conseguido demostrar la importancia de los autoantígenos (y en particular los citrulinados) como iniciadores del proceso autoinmune, en diferentes modelos animales (Barra LJ, et al., 2011 [w/](#)) (van Gaalen F, et al., 2005 [w/](#)).

1.5. Clínica y tratamiento

Al inicio de la enfermedad, la AR suele producir inflamación persistente en las articulaciones de las manos, con extensión progresiva a las grandes articulaciones. Sin el tratamiento adecuado, la enfermedad tiende a progresar lentamente hacia la deformidad y destrucción de las articulaciones. Es frecuente que la artritis se acompañe de atrofia muscular y síntomas generales, como debilidad o fiebre.

Las remisiones espontáneas son infrecuentes y, cuando ocurren, no suelen ser duraderas. Si bien el objetivo de los nuevos tratamientos es alcanzar la remisión, en la mayoría de los casos se consigue tan sólo el control adecuado de la inflamación para minimizar el daño articular (Cajigas Melgoza JC et al., 2011) (Rintelen B, et al., 2013 [w/](#)) (Sanmartí Sala R, 2007) (Scott DL, et al., 2010 [w/](#)).

La mejor estrategia en la AR es el tratamiento precoz, ya que se relaciona con una evolución más favorable. A pesar de la introducción de múltiples tratamientos nuevos, ninguno de ellos proporciona una cura de la enfermedad, sino que frenan o retrasan su avance (Cañete Crespillo JD et al., 2008).

En la tabla 1 y la figura 1, se resumen los diferentes tipos de tratamientos actualmente utilizados, así como sus dianas terapéuticas, junto con un esquema representativo del modo de acción de los diferentes fármacos.

Tipo de fármaco		Subtipos	Mecanismo de acción
AINEs		Inhibidores no selectivos Inhibidores selectivos	Inhibición de Cox1 y Cox2 Inhibición de Cox2
Glucocorticoides			Inhibición de síntesis de ácido araquidónico Inhibición de (NFκB) y AP1 Efectos en receptores asociados a membrana y segundos mensajeros
FAMEs	Sintéticos	Metotrexato	Agente antifolato (Inhibe proliferación linfocitaria) Reduce glutatión
		Hidroxicloroquina	Interfiere en la presentación de antígenos.
		Sulfasalazina	Inhibe la función de los neutrófilos, reduce los niveles de inmunoglobulinas, interfiere en la activación de células T vía NFκB
	Biológicos	Antagonistas de TNFα	Bloquean el TNFα soluble o asociado a membrana
		Antagonista del receptor IL1	Molécula natural que compite con IL1 por sus receptores celulares
		Inhibidores de coestimulación de células T (<i>Abatacept</i>)	Análogo de la molécula CTLA4, que actúa como señuelo en la coestimulación por CD80, CD86
		anti-CD20 (<i>Rituximab</i>)	Induce la citotoxicidad a través de su unión al receptor de las células B maduras, provocando su depleción selectiva
		Antagonistas de la IL6 (<i>Tocilizumab</i>)	Bloquea receptor soluble y el unido a membrana de la IL6 evitando la señalización mediada por IL6 a través de gp130 y el sistema Jak-Stat

Tabla 1. Tipos de fármacos más utilizados en el tratamiento de la artritis reumatoide y sus principales mecanismos de acción.
AINE= Antiinflamatorios no esteroideos. Cox= ciclooxigenasa. NFκB= factor nuclear κB. AP1= proteína activadora 1. FAME=Fármacos modificadores de la enfermedad. TNFα= factor de necrosis tumoral α. IL= interleucina. CTLA= antígeno de linfocitos T citotóxicos. CD= clúster de diferenciación. Gp= glicoproteína.
Modificado de: Gaffo A, et al., 2006 *wl*.

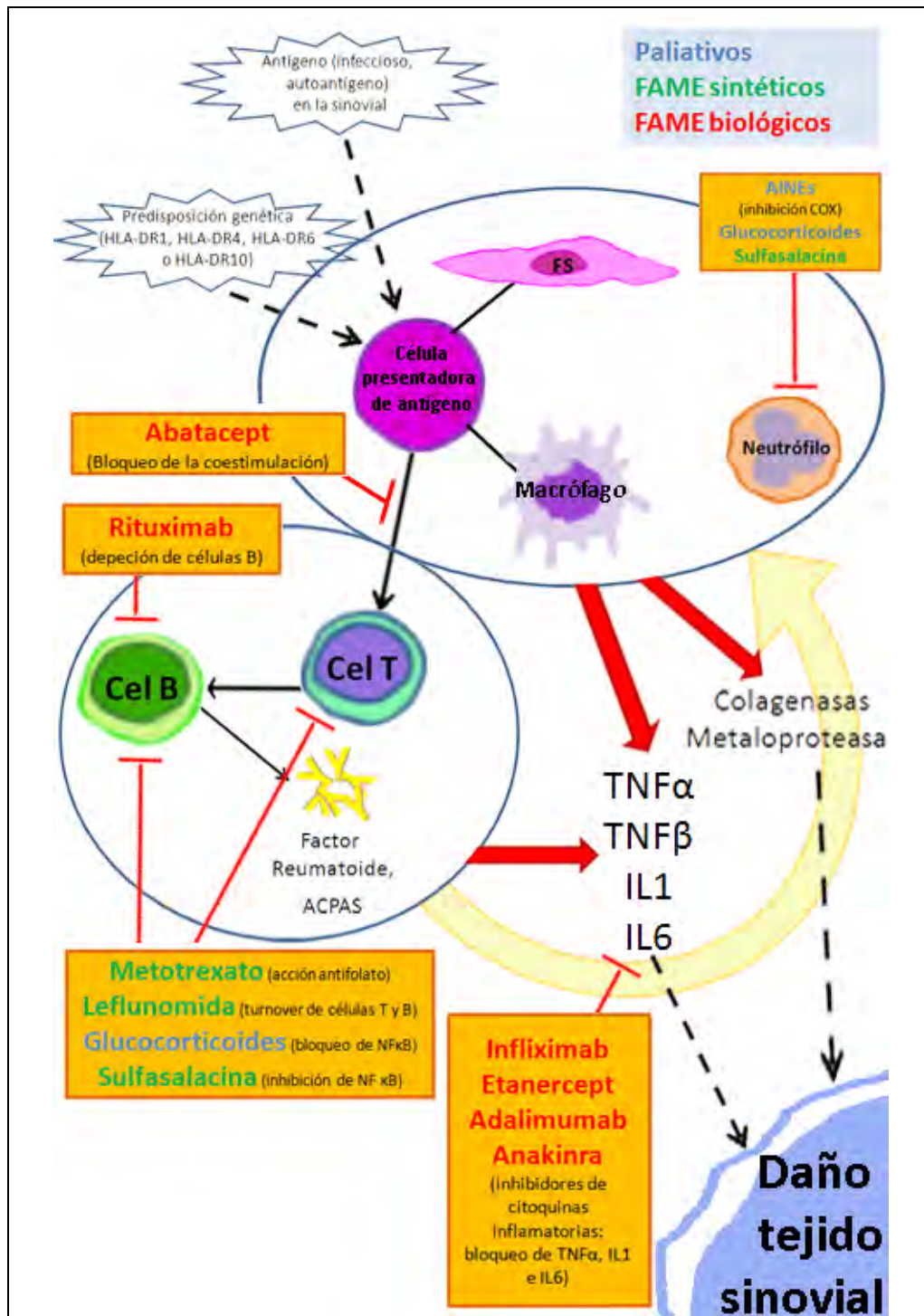


Figura 1. Esquema del proceso inflamatorio en el sinovio y mecanismo de acción de los fármacos utilizados para su tratamiento. Un proceso inflamatorio inicial, junto con susceptibilidad genética inicia la cascada inflamatoria mediante la activación de la inmunidad innata. Las células locales presentadoras de antígenos (macrófagos y fibroblastos sinoviales) interactúan con las células T iniciando la autorreactividad con la producción de factor reumatoide, ACPAs y células T autorreactivas. La inmunidad adquirida retroalimenta la inmunidad innata que produce un incremento en la liberación de enzimas que median el daño tisular y mediadores inflamatorios (TNF α , TNF β , IL1, etc.).

HLA= antígeno leucocitario humano. NF κ B= factor nuclear κ B. TNF= factor de necrosis tumoral. IL= interleucina. AINEs= antiinflamatorios no esteroideos. Cox= ciclooxigenasa.

2. La sinovitis reumatoide

2.1. *Histología de la membrana sinovial normal*

La membrana sinovial es el tejido que recubre las articulaciones diartrodiales. Aporta nutrientes y sustancias lubricantes al líquido sinovial para reducir la fricción durante el movimiento articular. Este líquido sinovial es un ultrafiltrado de plasma enriquecido con la secreción de sustancias como el ácido hialurónico, sintetizado por los sinoviocitos fibroblásticos o tipo B (Barland P, et al., 1962 [w/](#)) (Iwanaga T, et al., 2000 [w/](#)) (Ropes MW, et al., 1939 [w/](#)) (Smith MD, 2010 [w/](#)) (Tiwari N, et al., 2010 [w/](#)).

La membrana sinovial contiene dos regiones; la íntima o capa más superficial, compuesta por 1 a 3 capas de células, y la subíntima, o región más profunda, con una población celular menos densa, donde adquiere más importancia la matriz intersticial (Barland P, et al., 1962 [w/](#)) (Iwanaga T, et al., 2000 [w/](#)) (Kiener HP, et al., 2010 [w/](#)) (Tiwari N, et al., 2010 [w/](#)).

Pese a su disposición pseudoepitelial, la íntima carece de membrana basal y las células que la componen no tienen uniones firmes entre ellas. Se distinguen 2 tipos principales de células. Los sinoviocitos tipo A, de hábito macrofágico, minoritarias en condiciones normales y los sinoviocitos tipo B, de origen **fibroblástico (FS)**, que constituyen el 75-80% de las células y son los encargados de la síntesis de componentes del líquido sinovial, de la regeneración de la matriz extracelular y de dirigir el ultrafiltrado del plasma. Ambos tipos de células intimaes pueden presentar moléculas HLA-DR (Singh JA, et al., 2004 [w/](#)) y participar así en la presentación de antígenos durante procesos inflamatorios.

En la **subíntima** también se encuentran estos dos tipos celulares, si bien los fibroblastos intimaes muestran rasgos de diferenciación característicos. Además existen células endoteliales, terminaciones nerviosas autónomas, adipocitos, mastocitos y linfocitos T y B, en una intrincada matriz extracelular, compuesta principalmente de fibras colágenas (Castor CW, 1960 [w/](#)) (Iwanaga T, et al., 2000 [w/](#)) (Smith MD, et al., 2003 [w/](#); 2010 [w/](#)) (Tiwari N, et al., 2010 [w/](#)).

Ya en 1928, JA. Key propuso una clasificación de las membranas sinoviales, atendiendo a la composición de la subíntima, en tres subtipos: fibroso, aerolar y adiposo. La membrana sinovial fibrosa se caracteriza por la presencia de fibras de colágeno densas, se localiza en zonas sometidas a alta presión y presenta una única capa de células intimaes. La aerolar se caracteriza por una matriz con colágeno laxo,

presentarse en zonas donde la sinovial se mueve libremente y con una íntima gruesa, de 3-4 células y con superficie ondulada (vellosidades sinoviales). Por último, la adiposa tiene una matriz delgada imbricada en una capa de tejido adiposo y con una única capa de células aplanadas en su íntima (Castor CW, 1960 [w/](#)) (Iwanaga T, et al., 2000 [w/](#)) (Smith MD, et al., 2003 [w/](#); 2010 [w/](#)) (Tiwari N, et al., 2010 [w/](#)).

2.2. Cambios que se producen en el tejido durante la enfermedad

Durante el desarrollo de la AR se produce una transformación hipertrófica de la membrana sinovial. Existe una inversión en las poblaciones de células residentes, con aumento de la presencia de macrófagos (Smith MD, 2010 [w/](#)) tanto en la íntima como en la subíntima, en la que los adipocitos son sustituidos por un infiltrado de células mononucleares y células gigantes (Gravallese EM, et al., 1998 [w/](#)) (Smith MD, 2010 [w/](#)) (Tiwari N, et al., 2010 [w/](#)) (Wilkinson LS, et al., 1993 [w/](#)). De igual modo se produce un cambio fenotípico de los fibroblastos sinoviales (FS), que adquieren rasgos invasivos, con expresión de proteinasas, moléculas de adhesión y quimoquinas (Bradfield PF, et al., 2003 [w/](#)) (Ng CT, et al., 2010 [w/](#)) (Muller-Ladner U, et al., 1996 [w/](#)) (Shiozawa S y Tokuhisa T, 1992 [w/](#)). Estas células tienen capacidad de migrar y son resistentes a la apoptosis. Todos estos cambios dan lugar a un crecimiento tisular, que está acompañado de fenómenos de angiogénesis (Lefevre S, et al., 2009 [w/](#)) y que es capaz de invadir y destruir los tejidos adyacentes, cartílago articular y hueso subcondral.

El crecimiento del tejido se asocia a la aparición de vellosidades sinoviales, en las que se sitúan las células inflamatorias y una matriz extracelular desorganizada, con áreas de necrosis. Por su capacidad destructiva, se ha denominado a este tejido *pannus* (Barland P, et al., 1962 [w/](#)) (Gravallese EM, et al., 1998 [w/](#)). Dentro de este, se observan de forma característica, depósitos intratisulares de fibrina (Sanchez-Pernaute O, et al., 2003a [w/](#); 2003b [w/](#); 2006 [w/](#)).

2.2.1. Células inmunocompetentes del tejido sinovial

Como hemos mencionado, la AR es una enfermedad autoinmune cuyo órgano diana fundamental es la membrana sinovial. La aparición de la AR se relaciona con el reclutamiento sinovial de las diferentes subpoblaciones de células inmunocompetentes, principalmente linfocitos T, B y macrófagos.

2.2.1.1. Linfocitos T

Los linfocitos T han sido considerados tradicionalmente la principal diana terapéutica de la AR, debido a la implicación de diferentes genes de susceptibilidad de la enfermedad con la función de estas células (Cope AP, et al., 2007 [w/](#)) (Pablos Alvarez JL, 2009 [w/](#); 2011 [w/](#)). En particular, la AR se caracteriza por la activación de las células T colaboradoras (Th) (Cascao R, et al., 2010 [w/](#)) (Cope AP, et al., 2007 [w/](#)) (Gonzalez-Rey E, et al., 2006 [w/](#)) (Niu Q, et al., 2011 [w/](#)) (Pawlowska J, et al., 2010 [w/](#)) con diferenciación Th1 y Th17. Estas poblaciones tienen un carácter proinflamatorio en la enfermedad, mientras que la diferenciación linfocitaria Th2 y las células T reguladoras (T_{reg}), tienen un papel atenuador (Chalan P, et al., 2013 [w/](#)) (Pablos Alvarez JL, 2009 [w/](#)) (Sanchez-Ramon S, et al., 2010 [w/](#)) (Serrano Hernandez A, 2009 [w/](#)) (Swain SL, et al., 2006 [w/](#)).

2.2.1.2. Linfocitos B

Las células B producen los autoanticuerpos típicos de esta enfermedad, incluyendo el FR y los ACPA. Estas moléculas se emplean en el diagnóstico de la AR y tienen valor pronóstico. Los anticuerpos aparecen incluso años antes de la aparición de los primeros síntomas, forman inmunocomplejos y pueden activar el complemento, de este modo contribuyendo a la lesión tisular. Además, actúan como activadores de los osteoclastos, e inductores de la liberación factores proinflamatorios como el TNF α y el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANK-L) que participan en la resorción ósea (Diaz-Gonzalez JF y Ferraz Amaro I, 2007 [w/](#)) (McQueen FM y Issa S, 2013 [w/](#)).

Los linfocitos B actúan como células presentadoras de antígenos, lo que les confiere un papel principal en el desarrollo de la enfermedad. En diferentes modelos murinos se ha podido observar que la ausencia de células B protege de la aparición de la enfermedad (Diaz-Gonzalez JF y Ferraz Amaro I, 2007 [w/](#)). En el mismo sentido, el rituximab, un agente depletante de células B, ha demostrado una gran eficacia en el tratamiento de la AR.

Por último, los linfocitos B son fuente de citoquinas como IL1, TNF α y linfoxina, de este modo participando en la amplificación de la inflamación (Anolik JH, et al., 2009 [w/](#)) (Diaz-Gonzalez JF y Ferraz Amaro I, 2007 [w/](#)) (Páez MC et al., 2006) (Schlegel PM, et al., 2013 [w/](#)).

2.2.1.3. Células dendríticas

Las células dendríticas son, junto con los macrófagos sinoviales y las células B, responsables de la presentación de antígenos a las células T en la membrana sinovial. Simultáneamente, activan la maduración de las células T y su diferenciación a Th1 y Th17 mediante señales coestimuladoras y liberación de citoquinas, como TNF, IL1 e IL6 (Estrada-Capetillo L, et al., 2013 [w/](#)) (Gierut A, et al., 2010 [w/](#)).

2.2.1.4. Macrófagos

Los macrófagos sinoviales tienen gran importancia en el mantenimiento de la sinovitis (Kinne RW, et al., 2000 [w/](#)), principalmente mediante la sobreexpresión de gran cantidad de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y proteínas de degradación de la matriz.

Dentro de estas citoquinas cabe destacar el TNF α , expresado en la membrana sinovial artrítica principalmente por los macrófagos. Junto a IL1 e IL6, también expresadas por éstos, está considerado como el principal mediador soluble en la enfermedad (Drexler SK, et al., 2008 [w/](#)) (Kinne RW, et al., 2000 [w/](#)).

Los macrófagos contribuyen a la degradación de la matriz cartilaginosa, mediante la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMP) como MMP2 y MMP9 y la activación de los fibroblastos sinoviales. Por otra parte, participan en la resorción ósea, tanto a través del TNF α , como induciendo la expresión de RANKL (Parameswaran N y Patial S, 2010 [w/](#)) (Kinne RW, et al., 2000 [w/](#)). Los macrófagos estimulan la angiogénesis mediante la activación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la liberación de citoquinas como IL8 (Maruotti N, et al., 2007 [w/](#); 2013 [w/](#)) (Zhou M, et al., 2014 [w/](#)).

Finalmente, estas células tienen un papel fundamental en la presentación de antígenos y autoantígenos (Ireland JM y Unanue ER, 2011 [w/](#)), y constituyen un puente entre la inmunidad innata y adquirida en el proceso de la enfermedad. En conjunto, estas acciones hacen de los macrófagos sinoviales uno de los principales componentes celulares de la AR.

2.2.2. Células no inmunocompetentes del tejido sinovial.

2.2.2.1. Sinoviocitos fibroblásticos o tipo B

Los sinoviocitos B presentan características que los diferencian de otros fibroblastos; principalmente, su capacidad de síntesis de cadherina 11 y la expresión de uridín difosfoglucoasa deshidrogenasa (UDPGD) necesaria en la síntesis de ácido hialurónico. También expresan la molécula de adhesión celular vascular (VCAM) 1, que raramente se expresa en otros fibroblastos y podrían tener un papel importante en la unión de células mononucleares a la membrana sinovial (Bartok B y Firestein GS, 2010 [w/](#)).

Durante la AR, son éstas las células principalmente implicadas en la destrucción de cartílago, a través de la secreción de proteínas de degradación de la matriz (principalmente MMPs). Producen gran cantidad de citoquinas que contribuyen a perpetuar la sinovitis. En conjunto con macrófagos y osteoclastos forman el principal componente del *pannus*, en el cual estos sinoviocitos presentan un fenotipo proinvasivo diferente al de los sinoviocitos normales (Bartok B y Firestein GS, 2010 [w/](#)) (Karouzakis E, et al., 2009 [w/](#)) (Lefevre S, et al., 2009 [w/](#)) (Li X y Makarov SS, 2006 [w/](#)) (Neumann E, et al., 2010 [w/](#)).

Tradicionalmente se ha considerado a los fibroblastos sinoviales como un respondedor pasivo dentro del ambiente proinflamatorio (Bottini N y Firestein GS, 2013 [w/](#)). Los estudios realizados con explantes sinoviales en el modelo murino de inmunodeficiencia combinada grave (SCID) han supuesto un importante avance en el conocimiento del papel que desempeñan los fibroblastos sinoviales en la progresión de la AR. En estos ratones, que facilitan el estudio de la enfermedad en ausencia de la influencia del sistema inmune, se ha demostrado que los fibroblastos sinoviales pueden llevar al desarrollo de la sinovitis reumatoide y mantener su capacidad degradativa del cartílago en ausencia de la cooperación de los linfocitos T y B. Particularmente interesante es que la transformación que sufren los fibroblastos sinoviales reumatoides (FSAR) hacia un fenotipo pseudo-tumoral se mantiene *ex vivo* incluso en ausencia de estímulos proinflamatorios, o de participación de otras células inmunes. Todo ello confirma la importancia de estas células en la patogenia de la enfermedad (Bartok B y Firestein GS, 2010 [w/](#)) (Bottini N y Firestein GS, 2013 [w/](#)) (Firestein GS, 1996 [w/](#)) (Lefevre S, et al., 2009 [w/](#)) (Muller-Ladner U, et al., 1996 [w/](#)) (Neumann E, et al., 2010 [w/](#)) (Pierer M, et al., 2003 [w/](#)) (Tolboom TC, et al., 2002 [w/](#)).

3. Fisiopatología de la AR

La AR es una enfermedad heterogénea tanto en su desarrollo como en la progresión. Aunque todavía no se conoce con exactitud la secuencia patogénica que lleva a su puesta en marcha, se acepta que existen tres etapas secuenciales que actúan sobre un huésped susceptible. En primer lugar, la incidencia de algún mecanismo de inducción que provoque una inflamación inicial. En este estadio parece jugar un papel muy importante la inmunidad innata, principalmente mediante la actuación de los receptores tipo toll (TLR) y la activación de NFκB. Posteriormente, deben actuar factores que favorezcan la perpetuación de la inflamación y la creación de memoria inmunológica. A su vez, los autoanticuerpos dan lugar a una amplificación de la respuesta proinflamatoria. Finalmente, se produce la transformación de los sinoviocitos fibroblásticos hacia un fenotipo invasivo caracterizado por su capacidad destructiva, que es responsable de la degradación del hueso y el cartílago (Firestein GS y Zvaifler NJ, 2002 [w/](#)).

3.1. Mecanismos inductores

Los mecanismos inductores de la AR, permanecen aún sin aclarar y posiblemente difieran entre distintos pacientes. Se han barajado innumerables causas infecciosas, mutaciones, microfracturas espontáneas y la acción de factores ambientales de diversa índole (Sanchez-Pernaute O, et al., 2003a [w/](#)) (van Venrooij WJ y Pruijn GJ, 2008 [w/](#)) (Firestein GS y Zvaifler NJ, 2002 [w/](#)).

3.1.1. Inmunidad innata

La inmunidad innata es un sistema altamente conservado a lo largo de la evolución, que tiene la misión de detectar la presencia de posibles agresores en el organismo, así como otros peligros que pongan en riesgo la integridad del sujeto y se encarga de poner en marcha la respuesta defensiva suficiente para eliminar al agresor y activar la respuesta adaptativa, con el fin de optimizar la defensa en el caso de un nuevo ataque.

La inmunidad innata basa su actuación en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRP), como los TLR, receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo GIR (genes inducibles por ácido retinoico), complemento y receptores del Fc (fracción cristizable de los anticuerpos). La activación celular subsiguiente da lugar a la liberación de diferentes citoquinas y quimioquinas a través de diferentes

activadores de la transcripción, como NFκB, los factores reguladores del interferón (IFN) 3/7 y/o proteína activadora 1 (AP1) (Baccala R, et al., 2009 [w/](#)) (Gierut A, et al., 2010 [w/](#)) (Úsuga X y Ossa AC, 2012 [w/](#)) (Zhong B, et al., 2006 [w/](#)). El sistema inmune innato puede también reconocer marcadores de daño tisular o trauma (DAMP) (Bianchi ME, 2007 [w/](#)), que activan las mismas rutas que los PAMPs. Al ser ligandos endógenos, los DAMP tienen una mayor capacidad de mantenerse expresados y perpetuar la inflamación.

La inmunidad innata está sujeta a una estrecha regulación, a través de diferentes mecanismos, que incluyen la síntesis de citoquinas antiinflamatorias como IL10, y de productos de respuesta temprana o tardía que autorregulan sus vías de activación, como el gen de la respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD) 88, el supresor de la señalización de citoquinas (SOCS) 1, la proteína 3 inducida por TNFα ó A20, o los inhibidores del factor nuclear κB (IκB) nucleares (Chiba T, et al., 2013 [w/](#)) (Liu Y, et al., 2013 [w/](#)).

3.2. Mecanismos de perpetuación

3.2.1. Autoantígenos y memoria inmunológica

El fracaso de los mecanismos de autorregulación favorece la puesta en marcha de la respuesta adaptativa, principalmente mediada por la presentación de antígenos a las células T a través del MHC por las células presentadoras de antígenos (APC). Pueden actuar como APC los macrófagos, las células dendríticas y los fibroblastos sinoviales (Boots AM, et al., 1994 [w/](#)) (Tran CN, et al., 2007 [w/](#)). Uno de los principales procesos de la AR deriva de la presentación de autoantígenos citrulinados al sistema inmune específico.

La citrulinación consiste en el cambio de un residuo arginina por el aminoácido neutro citrulina, por la acción de la familia de enzimas peptidil-arginín deiminadas (PAD). Las principales enzimas responsables del proceso en la membrana sinovial son PAD2 y PAD4 (Foulquier, C, et al. 2007 [w/](#)). Esta modificación postraduccional altera la estructura terciaria de las proteínas (Tarcsa E, et al., 1996 [w/](#)) y si afecta a los centros activos puede determinar alteraciones en su función (Chang X, et al., 2005b [w/](#)) (Ordóñez A, et al., 2009 [w/](#)), modificar las interacciones moleculares con los receptores inmunes (MHC) o afectar a su degradación enzimática (Beltrami A, et al., 2008 [w/](#)) (Sebbag M, et al., 2006 [w/](#)) (Bhattacharjee P y Bhattacharyya D, 2014 [w/](#)). Si bien la citrulinación peptídica no es un proceso exclusivo de la AR (Chang X, et al., 2005c [w/](#);

2005d [w/](#)), sí se observa de forma más abundante en las articulaciones de estos pacientes (Chapuy-Regaud S, et al., 2005 [w/](#)).

Los ACPAs, propuestos inicialmente por RL Nienhuis y E Mandema en 1964, han resultado ser el mejor indicador serológico de la AR (Manivelavan D y Vijayasamundeeswari CK, 2012) (Puszczewicz M y Iwaszkiewicz C, 2011 [w/](#)). Estos Ac se detectan años antes de la aparición de los síntomas (Nielen MM, et al., 2004 [w/](#)) (Rantapaa-Dahlqvist S, et al., 2003 [w/](#)) y están asociados con los factores de riesgo mejor caracterizados en la AR (Bellatin MF, et al., 2012 [w/](#)) (Mikuls TR, et al., 2010 [w/](#)) (Montes A, et al., 2012 [w/](#)) (Too CL, et al., 2012 [w/](#)) (van Beers JJ, et al., 2012 [w/](#)) (Willemze A, et al., 2012 [w/](#)).

Se han detectado múltiples epítomos asociados a la formación de ACPAs. La mayoría de ellos derivan de macromoléculas de la MEC. La fibrina es una de las proteínas característicamente citrulinadas en la membrana sinovial de la AR y también el principal sustrato de los ACPA en los pacientes.

La citrulinación puede ser responsable de la anormalidad estructural de la fibrina que se observa en las articulaciones reumatoides, caracterizada por un entramado muy tupido de sus fibras (Pretorius E, et al., 2011 [w/](#)) (Kwasny-Krochin B, et al., 2010 [w/](#)). Estas son más insolubles y resistentes a la acción de la plasmina, lo que facilita la degradación por mecanismos no constitutivos y la exposición de dominios modificados con capacidad antigénica (Ordonez A, et al., 2009 [w/](#)) (Sanchez-Pernaute O, et al., 2003a [w/](#)) (Bini A, et al., 1996 [w/](#)) (Hotary KB, et al., 2002 [w/](#)) (Sebbag M, et al., 2006 [w/](#)) (Bhattacharjee P y Bhattacharyya D, 2014 [w/](#)).

3.2.2. Mecanismos no autoantigénicos

La existencia de pacientes AR sin autoanticuerpos característicos (McInnes IB y Schett G, 2011 [w/](#)) (Sokolove J, et al., 2014 [w/](#)) y el desarrollo de artritis en ratones inmunodeficientes modificados genéticamente (Douni E, et al., 1995 [w/](#)) (Keffer J, et al., 1991 [w/](#)) (Komatsu N y Takayanagi H, 2012 [w/](#)) (Matmati M, et al., 2011 [w/](#)) desvelan la existencia de otros modelos sinérgicos y/o alternativos a la autoinmunidad en la perpetuación de la AR.

La AR se caracteriza por la elevada producción de citoquinas de origen macrófago y fibroblástico, entre las que destacan IL1 β , TNF α e IL6. Estas moléculas estimulan la expresión de moléculas de adhesión y de otros mediadores solubles, que promueven la infiltración por células inmunes. De esta manera, se genera una cadena

de amplificación que ayuda a cronificar la enfermedad (Firestein GS, 1996 [w/](#)) (Komatsu N y Takayanagi H, 2012 [w/](#)) (McInnes IB y Schett G, 2011 [w/](#)).

Entre estas citoquinas, TNF está considerada como la citoquina pivotal. Se ha demostrado que su inhibición evita el resto de mecanismos patogénicos y producción de otras citoquinas (Simsek I, 2010 [w/](#)). La expresión de TNF no solo está aumentada en los diferentes modelos animales de artritis, sino que su inhibición mediante terapias específicas evita el desarrollo de las manifestaciones típicas de la enfermedad. La retirada de los tratamientos bloqueantes del TNF da lugar a la reaparición de los síntomas, lo que hace necesario el bloqueo de algún/os otro/s mecanismo/s perpetuadores (Firestein GS, 2004 [w/](#)), cuya naturaleza aún no ha sido dilucidada.

El impacto de la red de citoquinas macrofágicas sugiere que la activación de las células residentes (fibroblastos y macrófagos) antecede al resto de procesos y constituye, por tanto, el principal elemento a donde deben dirigirse las dianas terapéuticas (McInnes IB, et al., 2000 [w/](#)) (Raza K, et al., 2005 [w/](#)).

3.3. Mecanismos de progresión

El rasgo fundamental de la AR, en relación a otras artropatías inflamatorias crónicas es la transformación hipertrófica de la membrana sinovial. Diversos estudios han demostrado que ello se relaciona con un cambio en el fenotipo de los FSAR, que desarrollan características de tipo pseudotumoral. Estas características se mantienen incluso en los subcultivos o, como se ha mencionado, en modelos *in vivo* sin la influencia de células inmunes (Bartok B y Firestein GS, 2010 [w/](#)) (Lefevre S, et al., 2009 [w/](#)).

3.3.1. La transformación invasiva

Los FSAR se caracterizan por diferentes alteraciones. En un primer lugar, esta población celular muestra un **crecimiento excesivo**, tanto en la íntima como en la subíntima, que no parece dependiente de un aumento de su índice de proliferación, sino asociado a una resistencia al efecto de factores proapoptóticos (Bottini N y Firestein GS, 2013 [w/](#)) (Firestein GS, 1996 [w/](#)) (Korb A, et al., 2009 [w/](#)) (Meinecke I, et al., 2007 [w/](#)) (Ospelt C y Gay S, 2008 [w/](#)) (Pap T, et al., 2005 [w/](#)) (Yamanishi Y, et al., 2005 [w/](#)). Además, los FSAR muestran un **carácter invasivo**. Son capaces de migrar e invadir el cartílago, a través de moléculas de adhesión y proteasas que degradan la matriz pericelular (Lefevre S, et al., 2009 [w/](#)) (Muller-Ladner U, et al., 1996 [w/](#)) (Neumann E, et al., 2010 [w/](#)) (Tolboom TC, et al., 2002 [w/](#)). Finalmente presentan un

carácter proinflamatorio mediante una incrementada liberación de citoquinas, quimoquinas y factores angiogénicos (Bottini N y Firestein GS, 2013 [w/](#)) (Guerne PA, et al., 1989 [w/](#)) (Muller-Ladner U, et al., 2007 [w/](#)) y se localizan en los frentes de invasión de hueso y cartílago articular.

Estas características se mantienen de manera estable incluso tras varios pases en cultivo, por lo que se han puesto en relación con alteraciones epigenéticas (Firestein GS, et al., 1997 [w/](#)) (Huber LC, et al., 2007 [w/](#)) (Klein K, et al., 2012 [w/](#)) (Ross KA, 2011 [w/](#)) (Sanchez-Pernaute O, et al., 2008 [w/](#); 2010 [w/](#)) (Stanczyk J, et al., 2008 [w/](#)) (Da Silva TR, et al., 2005 [w/](#)) (Karouzakis E, et al., 2009 [w/](#)) (Nakano K, et al., 2012 [w/](#)) (Nile CJ, et al., 2008 [w/](#)).

3.3.2. Transformación hipertrófica y depósito de fibrina

La acumulación intraarticular de fibrina es una de las características más llamativas de la sinovitis, tanto en la artritis reumatoide como en modelos experimentales de la enfermedad (Salvi R, et al., 2000 [w/](#)). Numerosos trabajos han abordado tanto el origen de los depósitos, como su posible contribución al desarrollo y perpetuación de la artritis reumatoide.

El incremento de la permeabilidad local durante la inflamación favorece el exudado de los componentes del plasma a la articulación, incluyendo fibrinógeno y zimógenos (Sanchez-Pernaute O, et al., 2003a [w/](#)). Aunque este proceso es inespecífico, se ha observado por diferentes métodos que los pacientes con AR tienen una activación de la hemostasia tisular no compensada con una fibrinolisis proporcional (Andersen RB y Gormsen J, 1970 [w/](#)) (Baat EA, et al., 2000 [w/](#)) (Chang X, et al., 2005a [w/](#)) (Salvi R, et al., 2000 [w/](#)) (Song JJ, et al., 2011 [w/](#)).

Por otra parte, la fibrina se caracteriza en los pacientes con AR por la existencia de un entramado fibrilar muy tupido (Pretorius E, et al., 2011 [w/](#)) (Kwasny-Krochin B, et al., 2010 [w/](#)) que determina una particular resistencia de las mallas a la degradación y a su aclarado a través del sistema linfático.

Basándonos en estudios realizados en artritis inducida por antígeno y en muestras sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, nuestro grupo entre otros, ha postulado que la propia naturaleza insoluble de la fibrina podría alimentar el crecimiento invasivo y la aparición de neoepítomos antigénicos en la enfermedad (Chapuy-Regaud S, et al., 2005 [w/](#)) (Sanchez-Pernaute O, et al., 2003a [w/](#)).

Así, se ha descrito la degradación de la fibrina por métodos no constitutivos, a través de las metaloproteinasas (Bini A, et al., 1996 [w/](#)) (Hotary KB, et al., 2002 [w/](#)). Del mismo modo, las células circundantes son capaces de secretar PAD que provocan la modificación de numerosos residuos de las cadenas de fibrina y alteran su estructura terciaria. Por otro lado, la fibrina (en menor grado su precursor soluble, el fibrinógeno) contienen diferentes dominios de interacción con células y diferentes proteínas de matriz y factores de crecimiento, como VEGF y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-2. Su interacción prolonga el tiempo de actuación de estos factores y facilita la sinergia en su actividad angiogénica (Sahni A, et al., 1998 [w/](#); 2000 [w/](#)).

La fibrina participa en los procesos fisiológicos de migración transvascular y reparación de heridas ejerciendo funciones que facilitan el reclutamiento y los cambios fenotípicos necesarios de diferentes poblaciones celulares, como las células endoteliales, neutrófilos, monocitos y fibroblastos. En estas células, produce un incremento en la expresión de diferentes citoquinas, factores de crecimiento y proteasas, que activan la angiogénesis e invasividad. Además también puede controlar el crecimiento celular y la apoptosis. Todas estas funciones son susceptibles de ocurrir de modo similar en el entorno patológico de la AR (Xu Q, et al., 1999 [w/](#)) (Clark RA, 2001 [w/](#)) (Liu X y Piela-Smith TH, 2000 [w/](#)) (Sahni A, et al., 1998 [w/](#); 2000 [w/](#); 2004 [w/](#)) (Sanchez-Pernaute O, et al., 2003a [w/](#); 2003b [w/](#)).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El propósito global de este estudio fue caracterizar la participación de la fibrina en el desarrollo de la sinovitis reumatoide. Partiendo de nuestros estudios previos, nuestra hipótesis fue que el contacto de los fibroblastos sinoviales con la fibrina intraarticular es capaz de provocar las respuestas proinflamatoria y proinvasiva típicas de estas células en la AR, sin precisar la participación de mediadores proinflamatorios ni del sistema inmune específico.

La respuesta celular a la fibrina en ausencia de la colaboración del sistema inmune específico supondría que la interacción fibrina-fibroblasto sinovial es un evento patogénico precoz en la cadena de mecanismos que llevan a la perpetuación de la enfermedad. A su vez, este hecho podría emplearse en el diseño de nuevos tratamientos frente a la AR. En este sentido, el propósito final de nuestro estudio es el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas, basadas en el proceso patogénico dependiente de la fibrina.

Para tratar de demostrar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos.

OBJETIVO 1. Estudiar el transcriptoma inducido por fibrina en células sinoviales reumatoides.

Para la realización de este objetivo, en un primer lugar se procedió a la creación de un sistema de interacción *in vitro* fibrina-FSAR. Mediante la utilización de este sistema se realizó un *microarray* de expresión génica en genoma completo que permitió detectar los efectos globales de la molécula en los FSAR. Posteriormente, se procedió a confirmar estos efectos mediante técnicas cuantitativas en nuevos cultivos celulares.

OBJETIVO 2. Identificar la ruta de activación de la fibrina en los fibroblastos sinoviales reumatoides.

Para la realización de este objetivo, se identificaron los principales activadores de la transcripción de los genes inducidos por fibrina en los estudios de *microarray*. A continuación se estudió el efecto de la exposición a fibrina sobre la activación del factor de transcripción NFκB. Posteriormente, se utilizaron métodos de bloqueo y de silenciamiento génico de 3 posibles

receptores candidatos a mediar los efectos de la fibrina en los FSAR, estudiando el efecto de su supresión en la estimulación de los genes de interés en respuesta a la fibrina.

OBJETIVO 3. Efecto de la citrulinación en la acción de la fibrina sobre la expresión y síntesis de citoquinas proinflamatorias.

Para la realización de este objetivo, en un primer lugar se procedió a la creación de un sistema de interacción *in vitro* fibrina citrulinada-FSAR. Posteriormente éste fue utilizado para comparar los efectos de la citrulinación de fibrina en comparación con su control no citrulinado sobre citoquinas proinflamatorias en FSAR.

OBJETIVO 4. Estudiar la posible acción proinvasiva de la fibrina en la sinovitis reumatoide.

Para la realización de este objetivo, se seleccionaron moléculas proinvasivas estimuladas por fibrina en los experimentos de *microarray* y se realizaron estudios de confirmación, mediante técnicas cuantitativas en nuevos cultivos celulares. Además, se estudió la distribución de fibrina y metaloproteasas en explantes de membrana sinovial de los pacientes. Finalmente, se realizaron estudios de expresión de metaloproteasas en FSAR utilizando el sistema de interacción *in vitro* descrito.

OBJETIVO 5. Estudiar posibles diferencias del efecto de la fibrina entre los fibroblastos sinoviales en la AR y en la artrosis.

Para la realización de este objetivo, se replicaron los estudios incluidos en los objetivos 1 y 2 con fibroblastos sinoviales procedentes de articulaciones con artrosis (FSOA) y se compararon los resultados entre ambas patologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención y manejo de tejidos

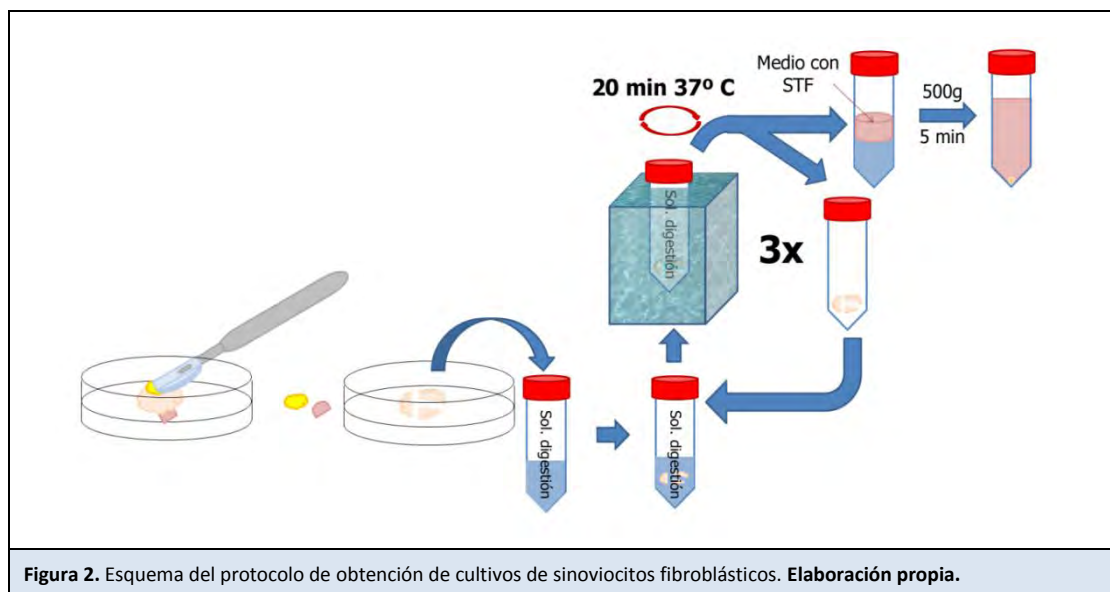
1.1. Población del estudio

El estudio se realizó en explantes articulares procedentes de pacientes diagnosticados de AR, según los criterios de 1998 del Colegio Americano de Reumatología (Arnett FC, et al., 1988 w/) o de artrosis (OA), obtenidos durante la cirugía de artroplastia total de rodilla. Las muestras se obtuvieron en la Fundación Jiménez Díaz de Madrid y en la Schulthess Klinik de Zürich y se procesaron para el aislamiento y cultivo de fibroblastos sinoviales y para estudios histológicos. Un total de 21 cultivos FSAR y 13 FSOA diferentes fueron empleados en la totalidad de los experimentos. Todos los participantes firmaron su consentimiento informado para la donación de las muestras. Los estudios realizados fueron aprobados por los comités de ética locales.

1.2. Cultivos celulares

Para el aislamiento de los fibroblastos sinoviales, la membrana sinovial se incubó durante 1 h con 0.4 UI/ml gentamicina (Braun) a temperatura ambiente (TA), se diseccionó y limpió de restos de tejido adiposo y muscular en condiciones de esterilidad. Las células se obtuvieron tras una disgregación mecánico-enzimática con 0.6 - 2.4 UI/ml dispasa (Gibco) en tampón fosfato salino (PBS) (Gibco) a 37 °C con agitación orbital.

Las células se cultivaron en Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (STF) (Biowhittaker), 2 mM/l L-Glutamina (Lonza), 60 UI/ml Penicilina (Lonza), 60 g/ml Streptomycin (Lonza) y 0.01 M HEPES [ácido N-(2-hidroxietil)-piperacín-N'-(2-etano-sulfónico)] (Invitrogen). Las células fueron utilizadas entre el 4º y 8º pase.



En estudios previos las células procedentes de subcultivos han sido caracterizadas en nuestro laboratorio, mediante tinción del factor VIII, Von Willebrand (vW) y la molécula KP1, para descartar contaminación endotelial y monocítica, respectivamente (Gutierrez S, et al., 1995 [w/](#)).

1.3. Muestras histológicas

Para los estudios histológicos, una vez extraída la membrana sinovial, ésta fue fijada inmediatamente en una solución de formaldehído al 4%, deshidratada en etanol e incluida en parafina. Cuando las muestras incluían restos óseos, estos fueron descalcificados mediante incubación en 10% ácido fórmico, durante 48 h.

2. Diseño experimental.

2.1. Polimerización *in situ* de fibrina

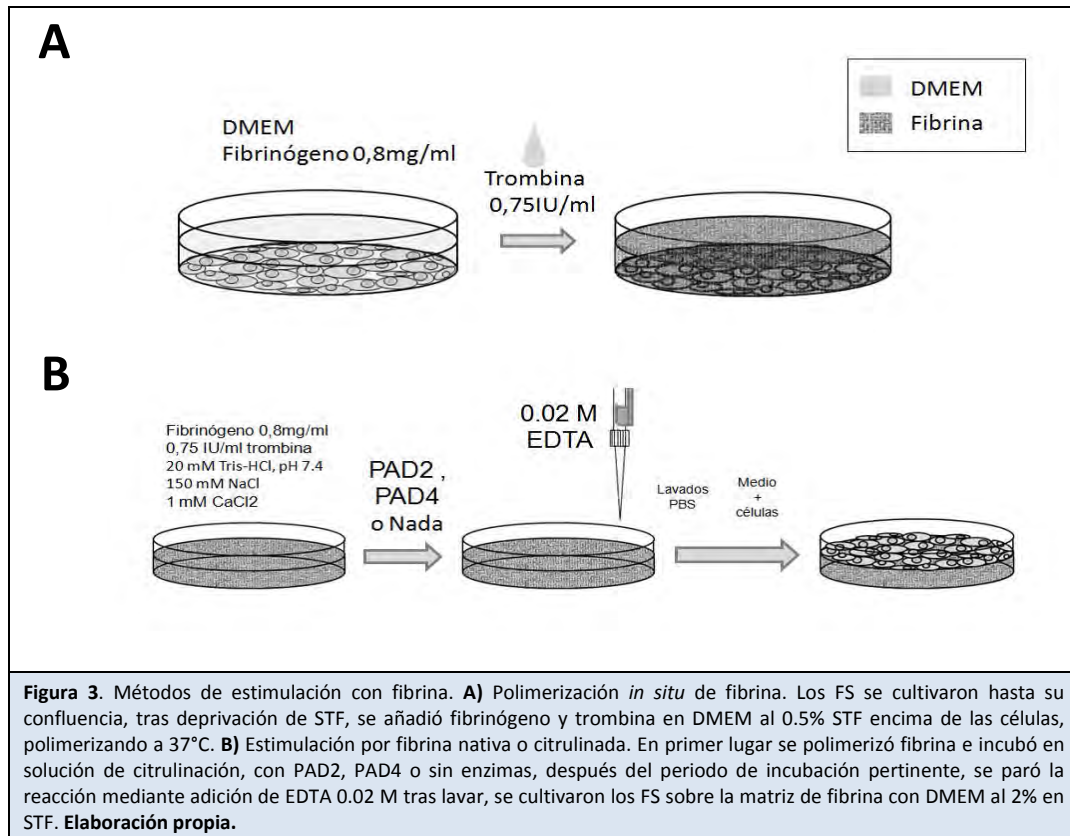
Los efectos de la fibrina nativa (no modificada) en FS se estudiaron mediante un sistema de polimerización *in situ* (Qi J, et al., 1997 [w/](#)). Para ello, las células confluentes fueron privadas de STF durante 48 h y lavadas con PBS. A continuación, se añadió una mezcla fría (4 °C) de fibrinógeno humano (Grifols) a las concentraciones mencionadas en los distintos experimentos con trombina humana recombinante (0.7 UI/ml) (Sigma-Aldrich) en DMEM sobre la monocapa celular (Fig 3A). Las placas fueron inmediatamente transferidas a la incubadora, donde se formó la matriz de fibrina en pocos minutos (Tuan TL, et al., 2003 [w/](#)) (Greiling D y Clark RA, 1997 [w/](#)) (Takizawa Y, et al., 2006 [w/](#)).

Las concentraciones empleadas para la estimulación celular fueron seleccionadas teniendo en cuenta las descritas para diferentes acciones biológicas de la fibrina (Liu X y Piela-Smith TH, 2000 w/) (Greiling D y Clark RA, 1997 w/).

2.2. Citrulinación de fibrina y fibrinógeno

Para establecer el efecto causado por la fibrina citrulinada, en comparación con la molécula nativa, se hicieron matrices de fibrina en placas de cultivo, mediante la mezcla de 0.8 mg/ml fibrinógeno y 0.7 UI/ml trombina en 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl. A continuación, las matrices fueron incubadas durante 2, 4 ó 15 h a 37°C, con medio de citrulinación (100 mM Tris-HCl, pH7.4, 10mM CaCl₂, 5 mM ditiotriol [Fluka]) y distintas concentraciones de las enzimas citrulinantes PAD2 o PAD4 recombinantes humanas (ModiQuest Research). Al finalizar el periodo de incubación, la reacción de citrulinación se paró mediante la adición de 0.02 M de ácido etildiaminotetraacético (EDTA). Las matrices fueron entonces sometidas a varios lavados para diluir los componentes de la reacción citrulinante. El fibrinógeno se sometió a las mismas condiciones de citrulinación. En ambos casos se realizaron controles en los que la fibrina o el fibrinógeno fueron incubados en medio citrulinante, en ausencia de las enzimas.

Tras establecer las condiciones óptimas de citrulinación, se empleó este tipo de matrices para sembrar sobre ellas los FS en 2% STF-DMEM (Figura 3B).



2.3. Experimentos de bloqueo

En estos experimentos, los FS fueron pretratados durante 90 min con 10 µg/ml Ac HTA125; un Ac bloqueante de TLR4 isotipo IgG2 de origen murino (Abcam) ó 10 µg/ml de IgG2 de ratón (BioLegend) como control de isotipo antes de su incubación con fibrina.

2.4. Experimentos de silenciamiento (siARN)

Los experimentos de silenciamiento se realizaron mediante sondas de ARN de silenciamiento (siARN) frente a TLR2, TLR4 e ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology). Las sondas se transfectaron en solución específica mediante nucleofección (Amaxa), a una concentración de 40 pmol, utilizando 7×10^5 células por reacción, con el programa U23 para fibroblastos primarios. Como controles, se incluyeron reacciones de transfección Mock con sondas no codificantes o *scramble* siARN, y células sometidas a los reactivos de nucleofección y/o al pulso U23, sin sondas específicas.

Para optimizar las condiciones de silenciamiento, como puede observarse en el anexo 2, se realizaron curvas de tiempo, en las que las células silenciadas se estimularon con 0.5 ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich). Al final de la incubación, se

midieron los niveles de expresión de ARNm de las diferentes moléculas silenciadas mediante qPCR.

Las células transfectadas con las sondas siARN fueron estimuladas 24 h después con fibrina polimerizada *in situ* (0.8 mg/ml fibrinógeno + 0.7 UI/ml trombina). En estos experimentos se emplearon 10^6 células por reacción. Los estudios de ARNm se llevaron a cabo a las 12 h de la estimulación, mientras que los estudios de proteína, tanto de lisado celular, como de sobrenadante, se llevaron a cabo a las 18 h.

2.5. Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó tras 18 y 24 h de incubación de los FS sobre matrices de fibrina, sometidas a las condiciones de citrulinación previamente mencionadas, en presencia o no de las enzimas PAD2 y PAD4. Para ello se emplearon 5 cultivos diferentes. Se sembraron 8000 células por pocillo (por triplicado) y se realizó un ensayo colorimétrico basado en la generación de sales de tetrazolio por las células vivas (MTS, Sigma-Aldrich) (Kumi-Diaka J, et al., 2004 [w/](#)).

2.6. Controles para descartar contaminación mediada por lipopolisacáridos

Para verificar la ausencia de contaminación por lipopolisacáridos (LPS) de los distintos reactivos empleados en nuestros experimentos, 3×10^4 células fueron privadas de suero durante 48 h ($n=3$) e incubadas con cada uno de los siguientes reactivos: 0.75 UI/ml de trombina, fibrina polimerizada *in situ* (0.8 mg/ml fibrinógeno y 0.75 UI/ml trombina), solución de citrulinación (dilución 1:200 en DMEM) y 36 µg/ml PAD2, en ausencia o presencia de 2 µg/ml de polimixina B (Sigma-Aldrich). A esta concentración, la polimixina (PMX) inhibe eficientemente la inducción de IL6 provocada por 2-500 ng/ml LPS en FSAR (datos no mostrados). Como control adicional, la enzima PAD2 fue desnaturalizada por calor durante 3 min a 80 °C antes de la estimulación. Tras 15 h, se midió el nivel de IL6 en los sobrenadantes de los cultivos o en los homogeneizados de las matrices de fibrina, mediante ELISA.

3. Análisis proteicos

3.1. Inmunohistoquímica

Para estudiar la distribución de fibrina, y las metaloproteinasas MMP1 y MMP3, se realizaron técnicas de inmunodetección con doble marcaje en explantes de

membranas sinoviales de pacientes sometidos a artroplastia, algunos de los cuales presentaban áreas de invasión en cartílago y hueso. Para ello, se rehidrataron los tejidos y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 6% y 3% de suero del hospedador del anticuerpo (Ac) secundario; posteriormente se incubaron durante la noche a 4 °C con los Ac específicos a 10 µg/ml fibrina (Abcam) y a 25 µg/ml MMP1 y MMP3 (R&D). Los Ac secundarios se incubaron durante 1 h, a TA. Como control, se incubaron los tejidos con la isoforma IgG autóloga correspondiente a los Ac primarios. La inmunorreactividad frente a fibrina se detectó mediante técnicas de peroxidasa e Histogreen (Abcys); como contraste se utilizó nuclear fast red (DAKO). La MMP3 se detectó con un Ac secundario biotinilado, seguido de incubación con avidina-biotina-peroxidasa y revelado con diaminobencidina. El contraste se hizo con hematoxilina. Para medir MMP1, se utilizó un Ac marcado con fosfatasa alcalina. Como sustrato se utilizó nitroazul de tetrazolio y 5-bromo 4-cloro 3 indolil fosfato y el tejido se contrastó con nuclear fast red. Para inhibir las peroxidasas y fosfatasa alcalina endógenas se utilizó H₂O₂ al 1% en metanol y 5 mM de levamisol, respectivamente.

3.2. Estudios de inmunofluorescencia

Las células se sembraron en portaobjetos de ocho pocillos (Nunc) hasta llegar a confluencia, siendo entonces privadas de suero durante 48 h y estimuladas con 0.8 mg/ml de fibrina durante diferentes tiempos. Al final de la incubación, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2%, se permeabilizaron con 0.1% Tritón-PBS y se incubaron con anticuerpos específicos en 0.1% BSA-PBS a 4 °C durante la noche. Se emplearon Ac de Santa Cruz Biotechnology frente diferentes componentes del complejo transcripcional κB (NFκB) humano, incluyendo Ac anti inhibidor alfa de NFκB (IκBα) total (hecho en cabra), anti IκBα fosforilado (procedente de conejo), anti IκBβ humano (conejo) y anti p65 humano (conejo). Posteriormente, se aplicaron los Ac secundarios IgG anti-conejo Alexa 488 (Invitrogen) o anti-cabra Cy5 IgG (Jackson ImmunoResearch) durante 1 h a TA, en oscuridad. Después de varios lavados, las muestras se montaron con Vectashield y DAPI (Vector laboratorios) y fueron visualizados con un microscopio confocal (Leica SP5).

3.3. Homogenización de fibrina para estudios de proteínas

Al final del periodo de incubación, las matrices de fibrina se disolvieron en 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.1% de dodecilsulfato sódico (SDS), 1% Tritón-X 100, 0.1% deoxicolato sódico, 5mM de EDTA y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). El homogeneizado se centrifugó a 15000 xg durante 20 min a 4 °C y los

precipitados insolubles se descartaron, guardándose el sobrenadante a -80 °C hasta su uso en técnicas de detección por inmunoblot o por ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

3.4. Western blot/inmunoblot e inmunoprecipitación

Al final de las incubaciones, las células fueron inmediatamente lisadas en solución de Laemmli (Laemmli UK, 1970 w) en una concentración final de 1% p/v SDS, 10% v/v glicerol, 62.5 mM de tampón TrisHCl pH 6.8, 5% v/v de 2 β mercaptoetanol (ME) y 0.04% p/v de azul de bromofenol.

Los niveles de MMP3 en los sobrenadantes se determinaron mediante inmunoprecipitación. Para ello, una vez centrifugados para descartar los restos celulares, 100 μ l de los sobrenadantes y los homogeneizados de fibrina se incubaron con anticuerpo anti MMP3 durante 1 h a 4 °C. A continuación, se agregaron 20 μ l de protein A/G plus-agarose immunoprecipitation reagent (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron durante la noche en agitación a 4 °C. Tras realizar lavados, los complejos MMP3-A/G plus se mezclaron con tampón de carga.

Los extractos proteicos y los inmunoprecipitados, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE y transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas se bloquearon con 5% leche desnatada, 0.05% Tween en PBS, ó 5% BSA, 0.05% Tween en tampón tris salino (TBS) en el caso de las isoproteínas fosforiladas y se incubaron con los Ac específicos a 4 °C durante la noche. La detección se realizó con Ac secundarios marcados con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) durante 1 h a TA, seguida de revelado mediante quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare).

3.5. Medida de liberación de citoquinas

Los niveles de IL6 e IL8 en los homogeneizados de fibrina y sobrenadantes de cultivos se midieron mediante ELISA (BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6. Confirmación de la eficiencia de la citrulinación

Tras detener las reacciones de citrulinación, se recogieron los extractos proteicos y se prepararon para ser sometidos a electroforesis mediante gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y teñidos con azul Coomassie (Sigma-Aldrich). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas de los geles a membranas de

nitrocelulosa y fijadas en una solución de PFA al 4%. La detección de péptidos citrulinados en las membranas se realizó mediante Western blot, con los reactivos de Milipore anti-citrulline (modified) detection kit. Para ello, se bloquearon las membranas con una solución al 5% leche desnatada en TBS y se incubaron con Ac frente a péptidos con residuos citrulinados, empleando una dilución 1:5000. La detección se realizó utilizando Ac secundarios con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) y quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare).

4. Análisis de ácidos nucleicos

4.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN de los FS se llevó a cabo mediante columnas Mini RNAeasy (Qiagen) basadas en la adsorción de los ácidos nucleicos en geles de sílice (Melzak KA, et al., 1996 [w/](#)), con digestión de ADNasas (RNase free DNase set, Qiagen) durante 15 min a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2. Retrotranscripción

La cantidad y la pureza del ARN extraído se determinaron con el sistema NanoDrop. Se emplearon 300 ng de ARN para realizar la retrotranscripción utilizando concentraciones finales de tampón de retrotranscriptasa 1x, MgCl 5.5 mM, dNTP 2 mM, inhibidor de ARNasas 1x y 1.25 UI/μl de retrotranscriptasa Multiscribe RT (Applied biosystems) y hexámeros como cebadores. Las condiciones de la reacción fueron: 10 min 25 °C, 30min 48 °C, 5min 95 °C y atemperación a 4 °C. En cada caso se realizó una reacción como control negativo (NRT), en que el ARN fue incubado con todos los reactivos, en ausencia de retrotranscriptasa.

4.3. PCR cuantitativa

Los estudios de PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron con un detector ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems) mediante técnicas de Sybr Green, utilizando cebadores diseñados con el programa Primer3 (v. 0.4.0) (Koressaar T y Remm M, 2007 [w/](#)). La lista de los diferentes cebadores junto con su denominación se muestran en la Tabla 2. Cada reacción se realizó mezclando 6.5 μl de Sybr green master mix (Applied Biosystems), 1 μl de los cebadores correspondientes (11.25 μM) y 3.5 μl de agua. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

	Secuencia Sentido 5'-3'	Secuencia Anti-Sentido 5'-3'
A20	GCAATTGCCGTCACCGTTCTGT	TCCGGAAGCTTGTGCGCTG
Cox1	GCAGCTGAGTGGCTATTTCC	ACAGCAGCTCTGGGTCAAAT
Cox2	GAGCAGGCAGATGAAATACCA	TAAAGCGTTTGCGGTACTCA
End1	AGCCCTAGGTCCAAGAGAGC	TGTTGCCTTTGTGGGAAGTA
GAPDH	TGGAAGGACTCATGACCACA	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT
ICAM-1	CACCTATGGCAACGACTCCT	TCACACTGACTGAGGCCTTG
IKBα	AATTGCTGAGGCACTTCTGG	GTCTCGGAGCTCAGGATCAC
IL6	CTCTTCAGAACGAATTGACAAACAA	GAGATGCCGTCGAGGATGTAC
IL8	TTGGCAGCCTTCCTGATTTTC	TGGCAAACTGCACCTTCAC
IP10	AGAATCGAAGGCCATCAAGA	CCTTTCCTTGCTAACTGCTTTC
MyD88	ACCTGGAGAGAGGCTGAGTG	AGAGCAAGGAATGTGAC
PDGF	GCTGTCTGCAAGACCAGGA	GACCTGACTCCGAGGAATCTC
Synj2	TTTGCGGATGAACTGTCTTG	CTCTGCACAGTGTGTTGTTTCG
TLR2	GGGTTGAAGCACTGGACAAT	CTTCCTTGGAGAGGCTGATG
TLR4	GAGCTGTACCGCCTTCTCAG	CTGTCCTCCCACTCCAGGTA
TNFα	CAATCGGCCCCGACTATCTC	CCAAAGTAGACCTGCCCAGA
TNFAIP6	ACGGTCTGGCAAATACAAGC	ACACACCGCCTTAGCTTCTG
VCAM1	GAACCCAAACAAAGGCAGAC	GGGGGCAACATTGACATAAA
VEGF	CTGCTGTCTTGGGTGCATT	GGTGGAGGTAGAGCAGCAAG
MMP1	TGTGGACCATGCCATTGAGA	TCTGCTTGACCCTCAGAGACC
MMP3	GGGCCATCAGAGGAAATGAG	CACGGTTGGAGGGAAACCTA
MMP9	GGCCACTACTGTGCCTTTGAG	GATGGCGTCGAAGATGTTTAC
MMP13	TCCTACAAATCTCGCGGGAAT	GCATTTCTCGGAGCCTCTCA
MMP14	TGGAGGAGACACCCACTTTGA	GCCACCAGGAAGATGTCATTTTC
Tabla 2. Nombre y secuencia de los cebadores sentido y antisentido utilizados para la realización de las diferentes qPCR		

4.4. Microarray de expresión génica

Para realizar los estudios de expresión génica a gran escala se emplearon 10⁶ FSAR, procedentes de 2 cultivos primarios. Una vez confluentes, las células fueron privadas de suero durante 48 h e incubadas o no con 0.8 mg/ml fibrina polimerizada *in situ*. El ARN total se aisló según lo especificado previamente, se retrotranscribió y el

ADNc resultante se utilizó como muestra para su hibridación en un *microarray* de genoma completo (whole-genome Affymetrix GeneChipplate), con objeto de identificar los genes modulados por fibrina en estas células. Para cribar los resultados, se excluyeron todos aquellos genes no expresados en las células no estimuladas, así como aquellos cuya expresión no fuera al menos dos veces superior o inferior a la expresión en las células no estimuladas.

Una vez obtenidos la totalidad de los genes inducidos o inhibidos, se realizó una clasificación atendiendo a la función de los genes, tal como se indica en el anexo 1.

4.5. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Para detectar cambios en la activación de NFκB, se utilizaron 10⁶ células por condición. Los extractos nucleares se aislaron mediante lisis celular en 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 nM de ditioniol (DTT) y 0.2 mM PMSF, con inhibidores de proteasas a 4 °C durante 10 min, seguido de una incubación de 20 min a 4 °C con 20 mM HEPES, 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT y 0.2 mM PMSF. Las reacciones se prepararon con 5 µg de extracto nuclear, solución de unión y 10 ng sonda consenso de NFκB marcada, empleando los reactivos de Panomics. Los controles de la especificidad de la unión se realizaron añadiendo sonda sin marcar a la reacción. Las muestras se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, 120 V, 4 °C, 1 h. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nylon y se inmovilizaron con calor (80 °C, 1 h). El revelado se llevó a cabo con un conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) seguido de una incubación con la solución de sustrato proporcionada por el fabricante.

5. Obtención y análisis de datos

Para realizar los estudios de inmunohistoquímica se utilizaron 8 explantes de membranas sinoviales de pacientes sometidos a artroplastia, en los estudios de *microarray* se utilizaron dos cultivos primarios de FSAR, en el estudio EMSA un único cultivo, en el resto de estudios de confirmación de inducción con fibrina nativa a nivel génico (qPCR) y proteico (ELISA y WB) se utilizaron 6 cultivos primarios de FSAR y 9 FSOA, en los estudios de silenciamiento fueron 6 FSAR y 6 FSOA, en los test de contaminación por LPS fueron 3 los cultivos FSAR, mientras que en los ensayos de citrulinación y viabilidad fueron 5 FSAR.

En todos los estudios de expresión génica por qPCR se utilizó como control de amplificación de ARN genómico una muestra de cada ARN sometida a la reacción de retrotranscripción sin enzima (control NRT). Además, se analizó una reacción de la mezcla de PCR sin ARN por gen, para descartar amplificación inespecífica de los cebadores (control de H₂O). La especificidad de la amplificación se verificó mediante las curvas de disociación y los controles de H₂O. La expresión génica se calculó mediante el método $\Delta\Delta C_t$, utilizando como controles endógenos el ARN ribosomal 18S (ARNr) (Applied Biosystems) y GAPDH. Los datos se expresaron a continuación como porcentaje de cambio respecto a la media de la expresión de los controles no tratados.

En los ensayos de ELISA todas las muestras, controles y estándares se realizaron por duplicado. Una vez obtenidas las absorbancias se restó la media del estándar cero a todos los puntos. Los cálculos se realizaron a partir de la media de dichos duplicados y las concentraciones se calcularon mediante ajuste de regresión lineal, desestimando aquellos puntos donde las réplicas difirieron más de un 10%, tal como se indica en las instrucciones del fabricante.

En la inmunodetección de péptidos transferidos a membranas de nitrocelulosa los resultados se normalizaron según los niveles de α -Tubulina (Sigma) presentes en los lisados proteicos o mediante la tinción azul de Coomassie en el caso de los sobrenadantes.

Los datos están expresados como media y error estándar de la media. Las diferencias entre condiciones se midieron mediante métodos no paramétricos, empleando la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas y las de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para analizar las diferencias entre FSAR y FSOA. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron significativos. Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS v16.0.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. La fibrina es un estímulo proinflamatorio para los fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide

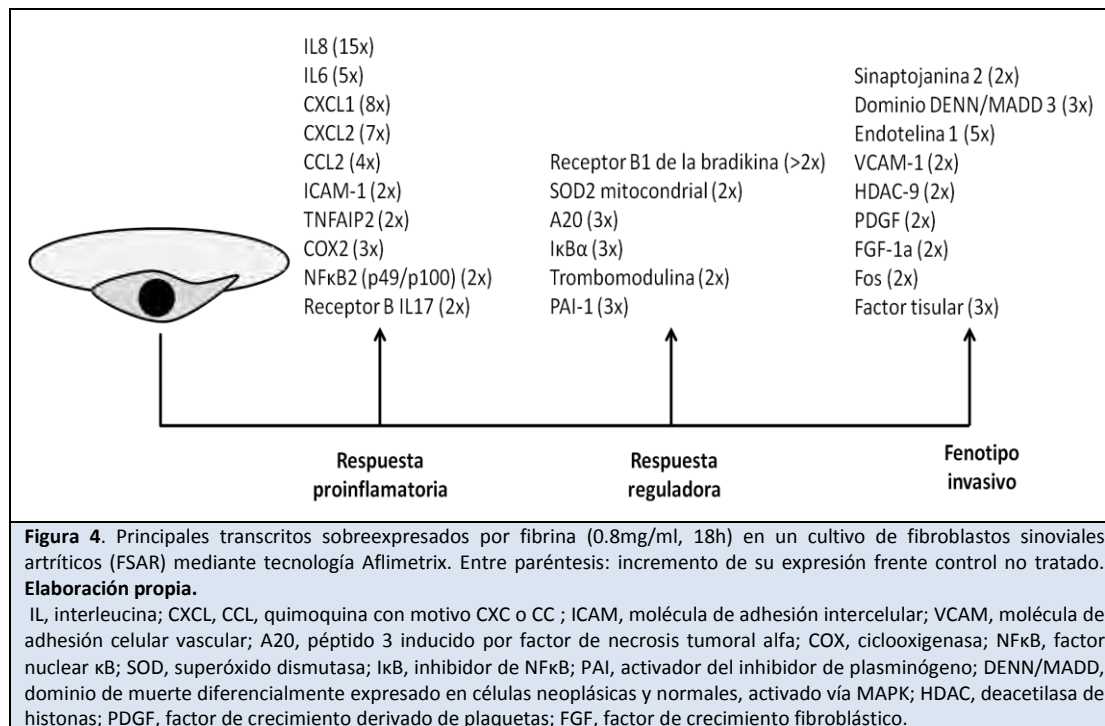
1.1. *Estudio del transcriptoma inducido por fibrina en cultivos de FSAR*

La acumulación de fibrina en las articulaciones artríticas es, junto con la transformación fenotípica proinvasiva de los FSAR, una de las características más llamativas de la enfermedad, tanto en humanos como en modelos animales (Salvi R, et al., 2000 [w/](#)) (Muller-Ladner U, et al., 1996 [w/](#)) (Bradfield PF, et al., 2003 [w/](#)) (Shiozawa S y Tokuhisa T, 1992 [w/](#)) (Ng CT, et al., 2010 [w/](#)) (Neumann E, et al., 2010 [w/](#)) (Lefevre S, et al., 2009 [w/](#)). Nuestra hipótesis de partida fue que la fibrina juega un papel importante en la generación de un microambiente proinflamatorio, en el cual se desarrolla y establece el fenotipo pseudotumoral de los FSAR (Whitaker JW, et al., 2013 [w/](#)) (Nakano K, et al., 2012 [w/](#); 2013 [w/](#)).

En los estudios de expresión de genoma completo, la fibrina produjo cambios en la expresión de más de 80 genes en los FSAR. Con objeto de comprender el efecto global de la fibrina sobre los FSAR hicimos una primera aproximación, agrupando las moléculas inducidas por fibrina según su participación en procesos biológicos. En la figura 4 se muestra un esquema de las principales rutas que identificamos con este agrupamiento funcional.

En particular, la fibrina, indujo un aumento en la expresión de diferentes mediadores proinflamatorios, incluyendo las interleucinas IL6 e IL8, las quimioquinas CXCL1, CXCL2 y CCL2, la molécula de adhesión ICAM-1 y la ciclooxygenasa (Cox) 2. Se observó también la estimulación de varias moléculas relacionadas con la regulación de la ruta del factor de transcripción kappa B (NFkB) como Ikb α y A20, también conocido como péptido 3 inducido por TNF α (TNFAIP) 3. Por otra parte, la fibrina provocó un aumento de la expresión de moléculas que participan en la respuesta de fase aguda y en la coagulación, como el receptor B1 de la bradiquinina, la trombomodulina y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). Finalmente, algunas de las moléculas sobreexpresadas por el contacto con la fibrina, como la molécula de adhesión VCAM-1, la sinaptojanina (Synj) 2, la endotelina (End) 1, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o la histona deacetilasa (HDAC) 9, se relacionan con la proliferación y el crecimiento en distintas estirpes

celulares (la lista completa de los genes modificados por la fibrina, así como una clasificación de los mismos se muestra en el anexo 1).



1.2. La fibrina induce la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL8 e IL6 en los FSAR

1.2.1. Confirmación de la inducción de IL8 e IL6 por fibrina en FSAR mediante estudios de qPCR

Con objeto de confirmar la estimulación mediada por fibrina observada en los estudios de *microarray*, seleccionamos en primer lugar las citoquinas IL8 e IL6, por su conocido papel patogénico en la AR. Para ello, llevamos a cabo estudios de expresión génica mediante qPCR en diferentes cultivos celulares de FSAR.

Las células confluentes se incubaron con fibrina (0.8 mg/ml) polimerizada *in situ*, durante 12 y 18 h (n= 6). En ambas condiciones, la estimulación con fibrina dio lugar a un incremento significativo de los niveles de ARNm de estas citoquinas, siendo mayor a las 12 h. A este tiempo de incubación, la expresión de IL8 aumentó 700 veces ($p < 0.05$) y la de IL6 aumentó 130 veces ($p < 0.05$) respecto a las células no estimuladas (figura 5A).

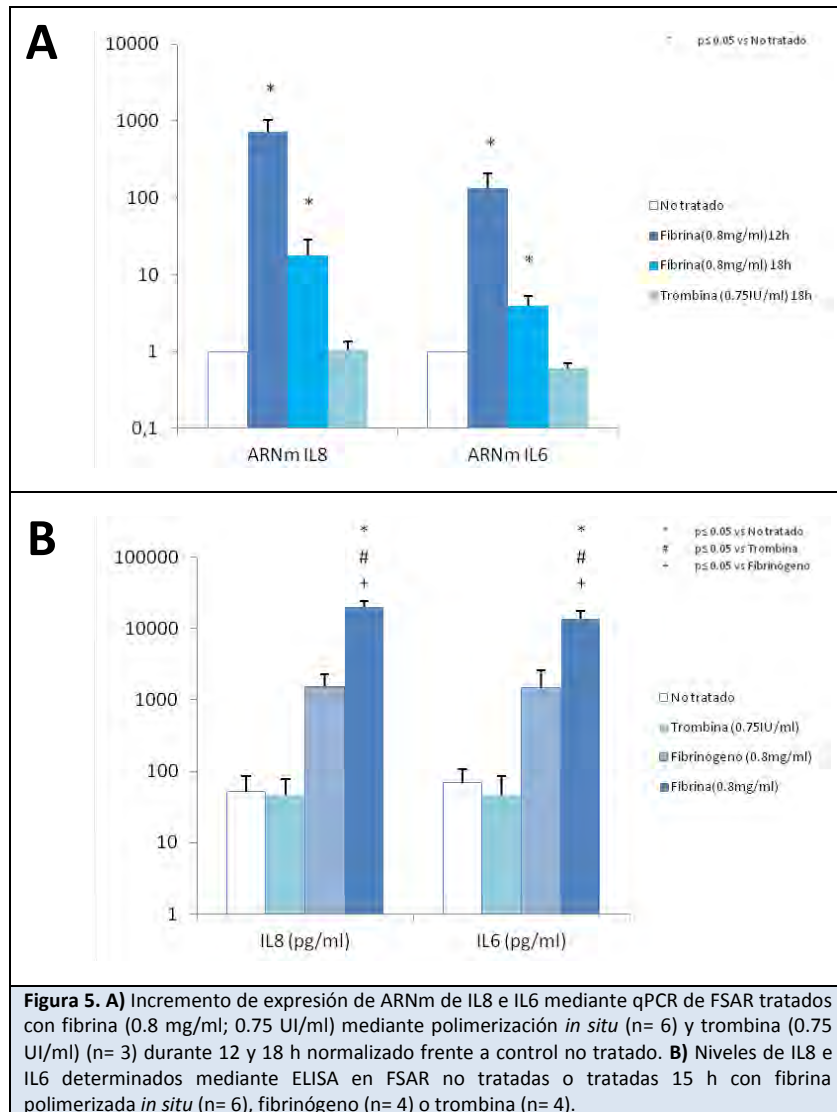
1.2.2. Concentración de IL8 e IL6 en el medio de cultivo tras incubación de FSAR con fibrina

Del mismo modo, la estimulación de FSAR durante 15 h con fibrina como se muestra en la figura 5B produjo un gran aumento en los niveles peptídicos de IL8 e IL6 en los sobrenadantes de los cultivos ($p < 0.05$) ($n = 6$).

1.2.3. Especificidad del efecto de la fibrina

La reacción de polimerización de la fibrina requiere la adición de trombina. Esta enzima ejerce acciones celulares a través de los receptores activados por proteasas (PARs). En nuestros experimentos, la incubación con trombina (0.75 UI/ml) durante 18 h ($n = 3$) no produjo diferencias significativas en la expresión de ARNm de las citoquinas en FSAR, respecto a las células sin tratamiento.

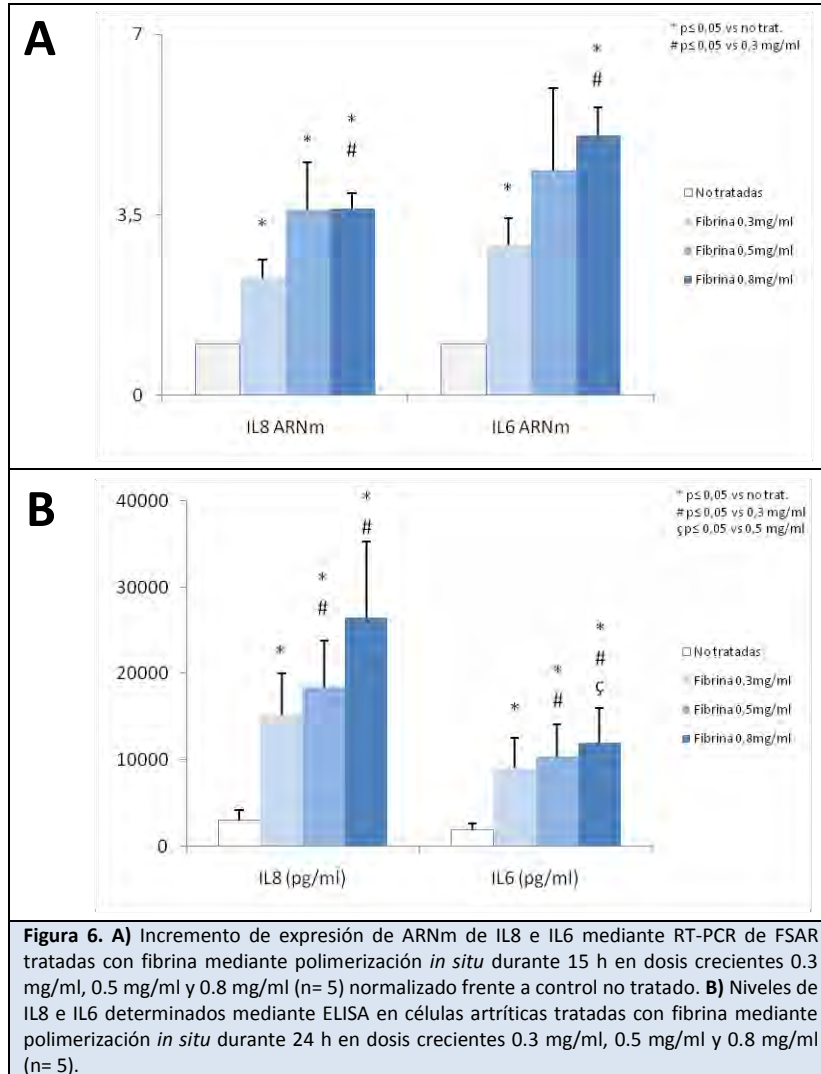
Del mismo modo, los niveles peptídicos de IL8 e IL6 en los sobrenadantes de FSAR no se modificaron al incubar las células con trombina ($n = 4$) durante 15 h respecto a las células sin tratamiento. Por otra parte, la incubación de los FSAR con fibrinógeno (0.8 mg/ml) en ausencia de trombina durante 15 h produjo un incremento en los niveles de ambas citoquinas en los sobrenadantes, aunque no alcanzó significación estadística respecto a las células no tratadas ($n = 4$).



1.2.4. Efecto de la dosis de fibrina sobre la inducción de IL8 e IL6 en FSAR

Los FSAR fueron incubados con concentraciones crecientes de fibrina, teniendo en cuenta los diferentes efectos celulares que han sido descritos en otros sistemas. En estos experimentos, se estimularon las células con 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml y 0.8 mg/ml de fibrina polimerizada *in situ* o con medio de cultivo durante 15 h. A este tiempo, la expresión génica de ambas citoquinas fue significativamente mayor con la mayor concentración de fibrina ($p < 0.05$, respecto a no tratado y 0.3 mg/ml).

Del mismo modo, medimos la concentración de los péptidos en los sobrenadantes de los cultivos a las 24 h de estimulación con las concentraciones de fibrina anteriormente mencionadas. En ambos casos, pudimos observar un incremento de los niveles de las citoquinas, de forma dosis-dependiente.



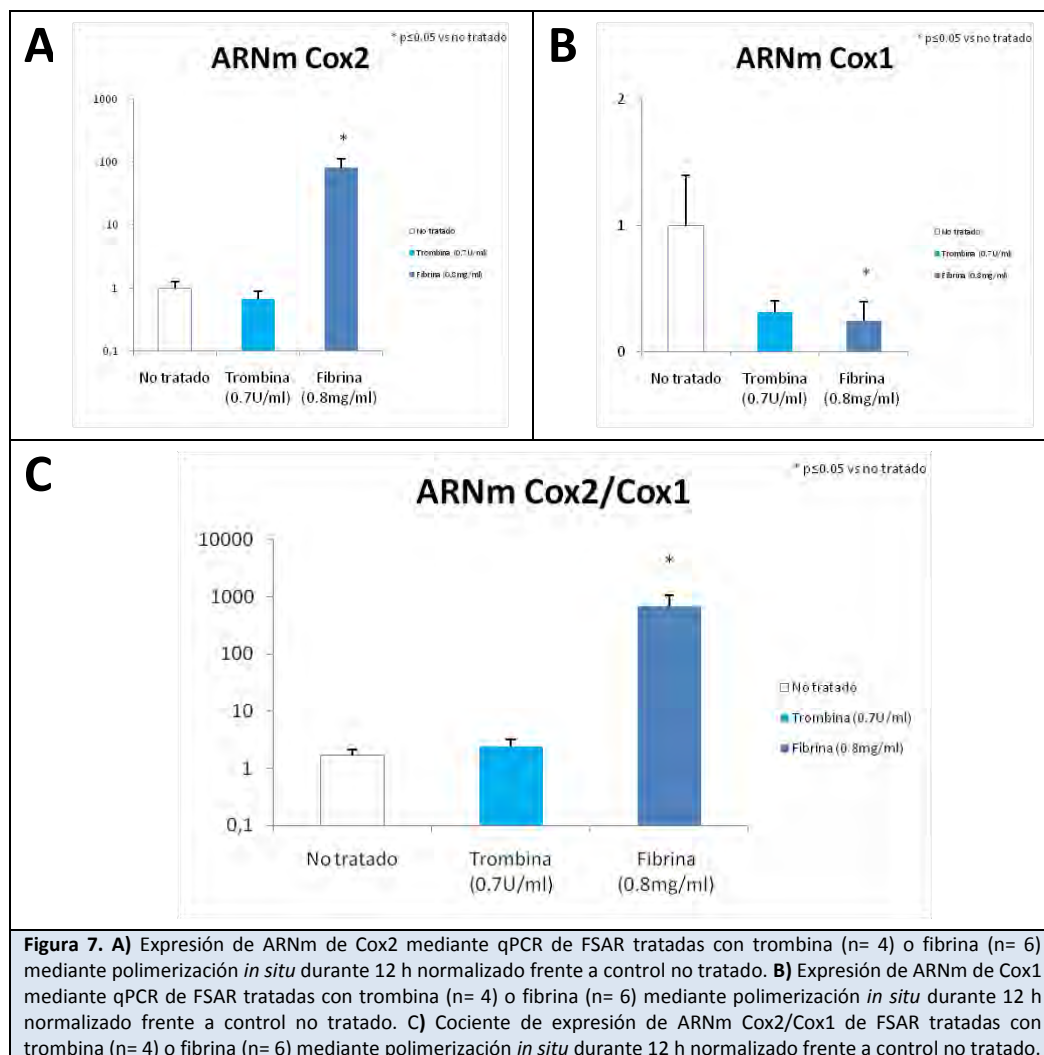
1.3. La fibrina induce la expresión de ciclooxygenasa 2 por los FSAR

1.3.1. Expresión de Cox2 y Cox1 en FSAR mediante qPCR

A continuación, quisimos confirmar que la estimulación de FSAR con fibrina es capaz de inducir la expresión de Cox2, tal y como habíamos observado en los estudios de *microarray*. Para ello incubamos las células con o sin fibrina en las mismas condiciones experimentales descritas previamente. Tras 12 h de incubación, observamos (figura 7A) niveles de ARNm de Cox2 80 veces superiores en las células

estimuladas frente a no estimuladas ($n=5$; $p<0.05$). En contraste, la expresión génica de Cox1 (figura 7B) resultó anormalmente reducida en las células tratadas con fibrina frente a la de las células no tratadas ($n=5$; $p<0.05$). Por otra parte, la incubación de las células con trombina (0.75 UI/ml) durante 12 h no produjo cambios en los niveles de ARNm de Cox2 ni de Cox1 en los FSAR respecto a las células no tratadas ($n=4$).

Como consecuencia de esta modulación en la transcripción de ambas moléculas, el cociente entre la expresión de Cox2 y Cox1, como puede observarse en la figura 7C, fue unas 400 veces superior en las muestras estimuladas con fibrina frente a no tratado ($p<0.05$).

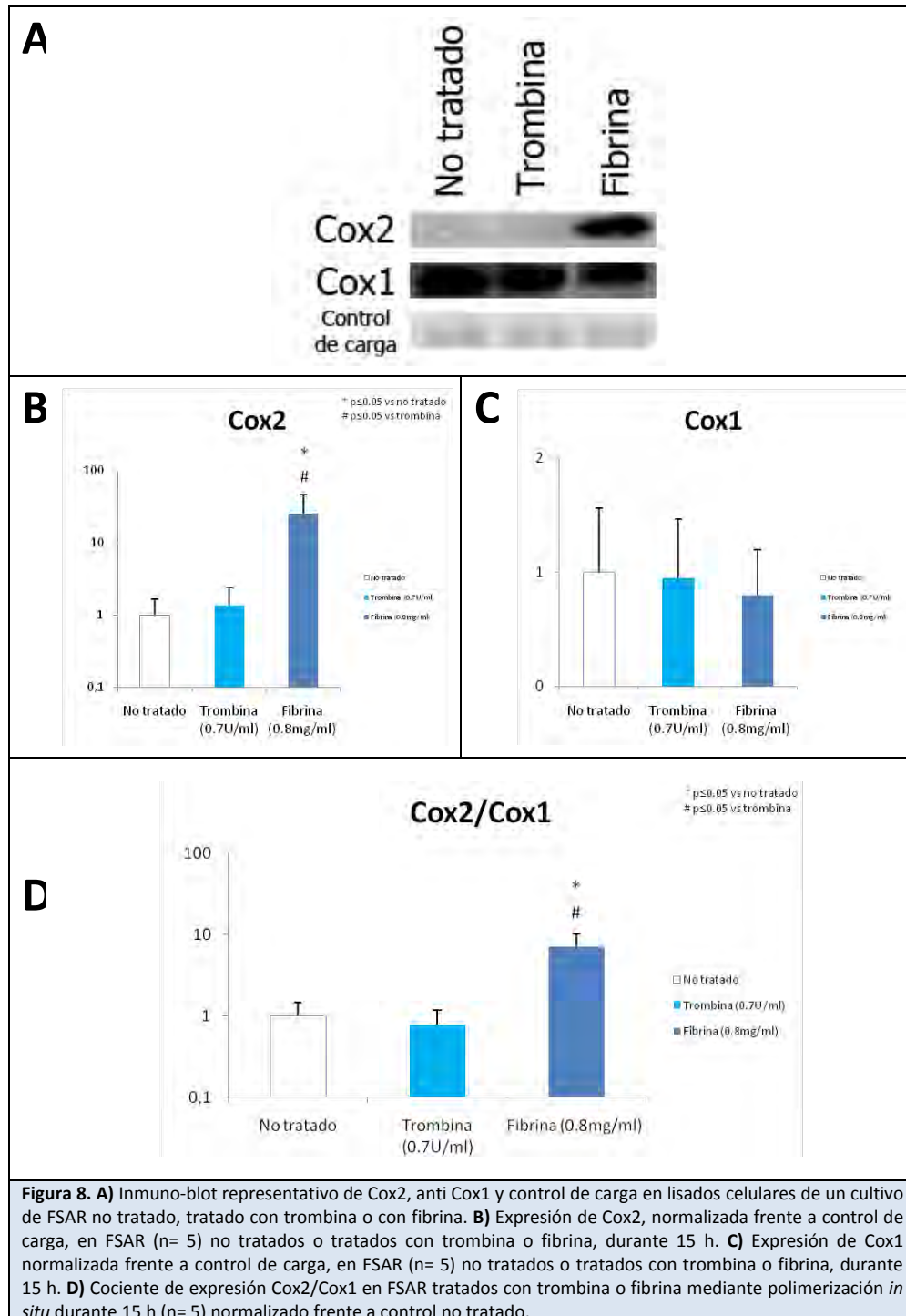


1.3.2. Detección de Cox2 y Cox1 en extractos proteicos de FSAR

Para estudiar los niveles proteicos de las isoformas de Cox en los FSAR, las células fueron estimuladas durante 15 h con fibrina (0.8 mg/ml). La detección de Cox2 y de Cox1 se realizó con técnicas de Western blot ($n=5$). El tratamiento con fibrina produjo un aumento significativo en los niveles de Cox2 frente a las células no

estimuladas ($p < 0.05$), mientras que los niveles de Cox1 prácticamente no sufrieron modificaciones (figura 8).

De forma similar a lo observado a nivel de ARN, la trombina no modificó los niveles peptídicos de Cox2 ni de Cox1 en los FSAR respecto a las células no estimuladas. Además, pudimos comprobar un aumento significativo en el cociente Cox2/Cox1 en las células estimuladas con fibrina respecto a las no estimuladas ($p < 0.05$) o a las incubadas sólo con trombina ($p < 0.05$).



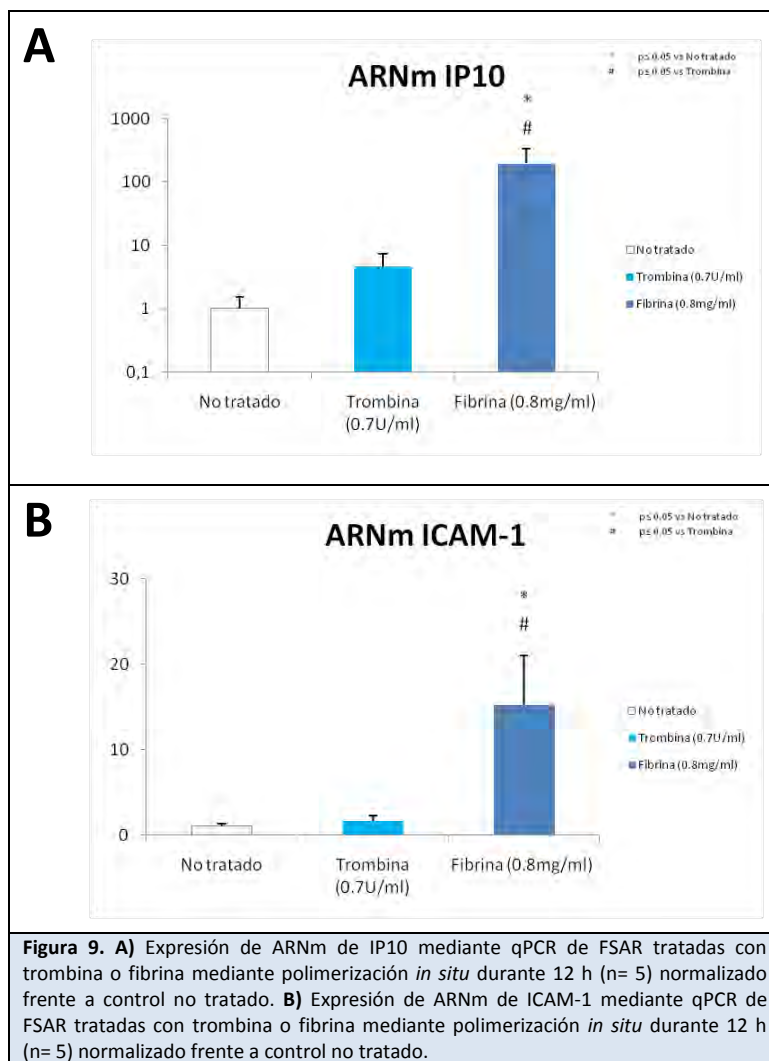
1.4. Confirmación de la inducción de otros genes proinflamatorios y moléculas reguladoras por fibrina en FSAR mediante estudios de qPCR

Una vez confirmada la inducción de IL6, IL8 y Cox2 por fibrina, seleccionamos para su estudio otros genes proinflamatorios y también moléculas antiinflamatorias o reguladoras.

1.4.1. Confirmación de la inducción de otros genes proinflamatorios por fibrina en FSAR mediante estudios de qPCR

Empleando las condiciones previas, pudimos observar un aumento de 200 veces en los niveles ARN de IP10 con la incubación con fibrina respecto a las células no estimuladas (n= 5, $p < 0.05$) o incubadas con trombina ($p < 0.05$), figura 9A.

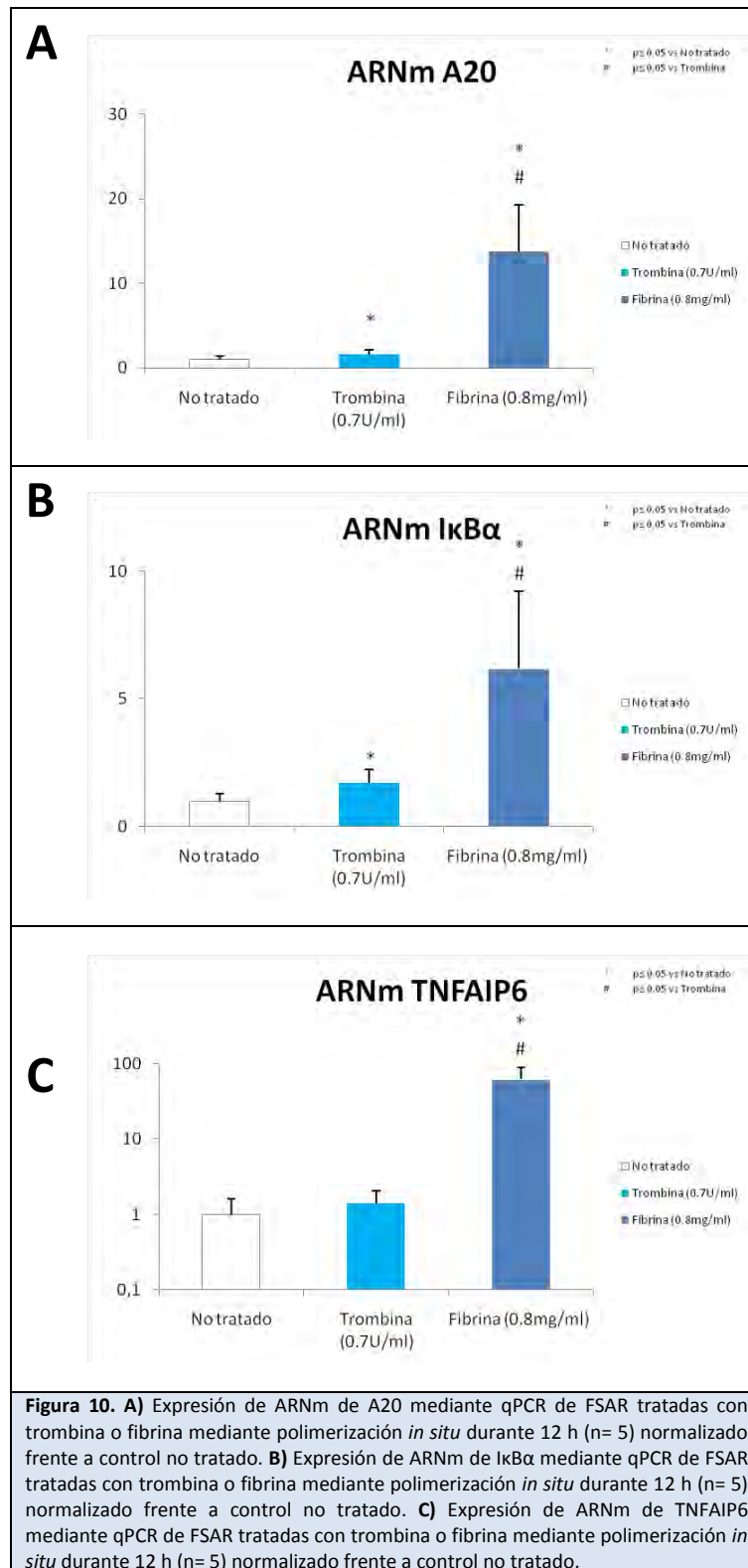
Asimismo, ICAM-1 mostró una expresión 15 veces superior a la de las células no estimuladas (n= 5, $p < 0.05$) y 10 veces mayor que la de células estimuladas con trombina ($p < 0.05$). Figura 9B.



1.4.2. Confirmación de la inducción por fibrina de moléculas reguladoras en FSAR mediante estudios de qPCR

Tras confirmar el efecto proinflamatorio de la fibrina en los FSAR, quisimos verificar su efecto sobre moléculas implicadas en la regulación de la ruta de NFκB, como A20, IκBα y TNFAIP6.

Tras 12 h de incubación con fibrina (figura 10A), observamos un incremento de la expresión de A20 de 14 veces respecto al nivel basal (n= 5; $p < 0.05$). La expresión de IκBα (figura 10B) alcanzó niveles 6 veces superiores a los basales (n= 5; $p < 0.05$), mientras que observamos un gran incremento en los niveles de TNFAIP6 (figura 10C) que fueron 60 veces mayores que en células no estimuladas (n= 5; $p < 0.05$). Por su parte, la trombina produjo un ligero incremento en los niveles de ARNm de A20 e IκBα (< 2 veces respecto al control, n= 5; $p < 0.05$), y no modificó la expresión de TNFAIP6.

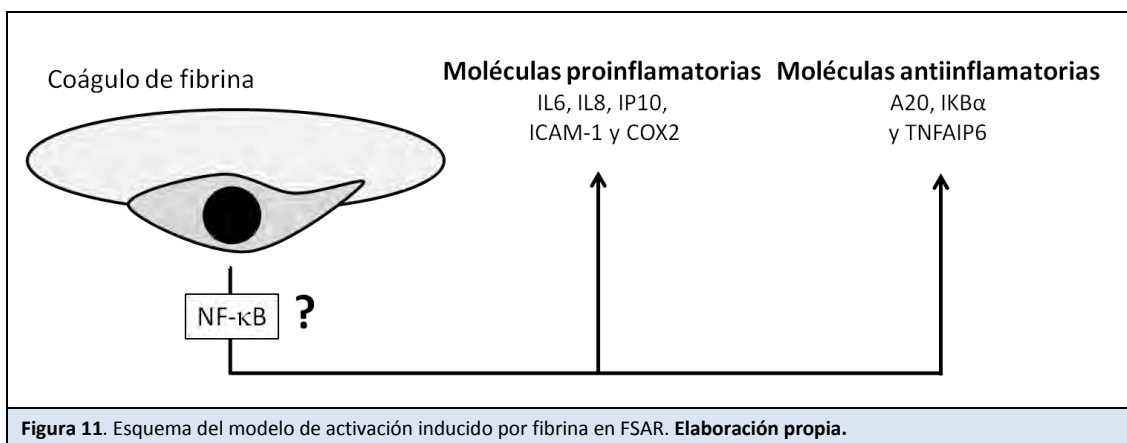


1.5. Resumen sección 1

En estos experimentos hemos demostrado que la fibrina induce la sobreexpresión de moléculas proinflamatorias, incluyendo IL6, IL8, IP10, ICAM-1 y Cox2 en los FSAR y que este efecto no se debe a la presencia de trombina en las matrices de fibrina.

Por otro lado la fibrina también provoca un aumento de expresión génica de las moléculas antiinflamatorias A20, I κ B α y TNFAIP6 en los FSAR. En la expresión de estos factores (al menos los dos primeros) sí podría intervenir la presencia de trombina en las matrices de fibrina.

La mayoría de estos mediadores son genes cuya transcripción depende de la unión de factor de transcripción NF κ B a sus promotores, lo que sugeriría que la fibrina actúa a través de este activador de la transcripción en los FSAR.



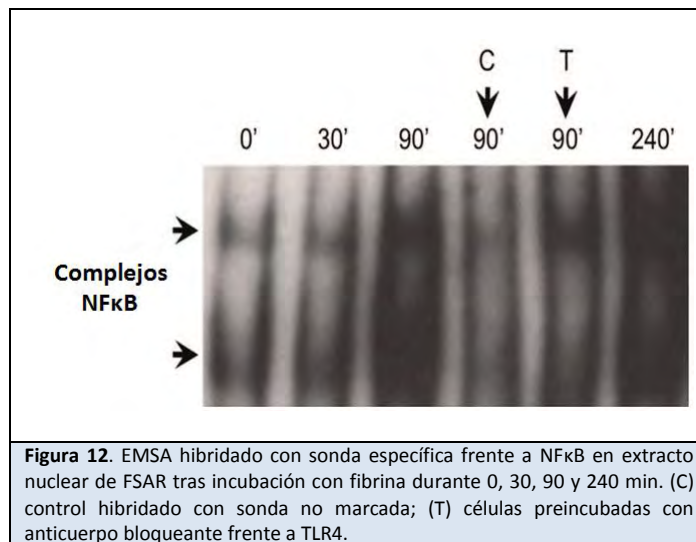
2. La fibrina activa al factor de transcripción NF κ B a través de los receptores TLR4 en los FSAR

2.1. Activación de NF κ B en FSAR incubados con fibrina

2.1.1. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética

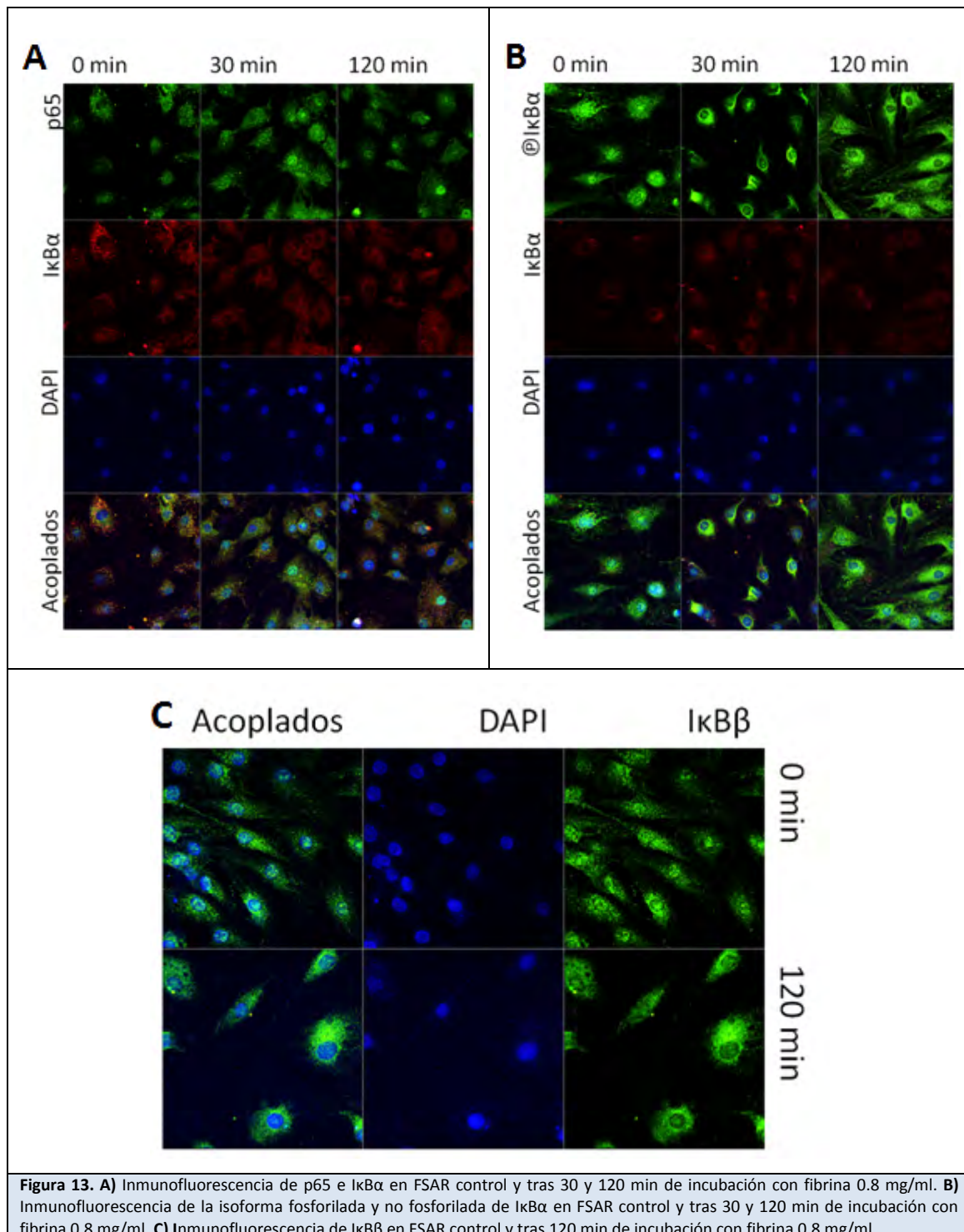
Para demostrar la implicación de NF κ B en el efecto proinflamatorio de la fibrina, se realizó un ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) con una sonda de oligonucleótidos consenso de NF κ B, en extractos nucleares de células no estimuladas ó expuestas a fibrina durante 30, 90 y 240 min (n= 1). Como muestra la figura 12, a los 90 y 240 min hubo un incremento de unión de la sonda. Se incluyó un control en el que las células fueron preincubadas con anticuerpos bloqueantes frente a

TLR4, dado que se ha descrito la capacidad de la fibrina de unirse a este receptor en macrófagos (Smiley ST, et al., 2001 w/). Las células preincubadas con el Ac mostraron una disminución en las bandas de retardo de unión específica a NFκB respecto a las no preincubadas.



2.1.2. Estudios de inmunofluorescencia de p65 y las subunidades alfa y beta de I-κappaB

Mediante técnicas de microscopía confocal, quisimos comprobar por otro método, el proceso de activación y migración al núcleo de NFκB en FSAR tras incubación con fibrina. Las células fueron estimuladas con fibrina (0.8 mg/ml) durante 30 y 120 min. Como se observa en la figura 13A se produjo una translocación de la subunidad p65 desde el citoplasma hacia el núcleo, mientras que el inhibidor de NFκB, IκBα permaneció en el compartimento citoplasmático durante el periodo de estudio. Además, la señal de IκBα se fue reduciendo progresivamente. Por otra parte, se observó un bombeo de IκBβ y la isoforma fosforilada de IκBα (figuras 13B y 13C) en dirección opuesta a la de p65 (desde el núcleo hasta el citoplasma), todo ello indicando la activación de este regulador de la transcripción génica.

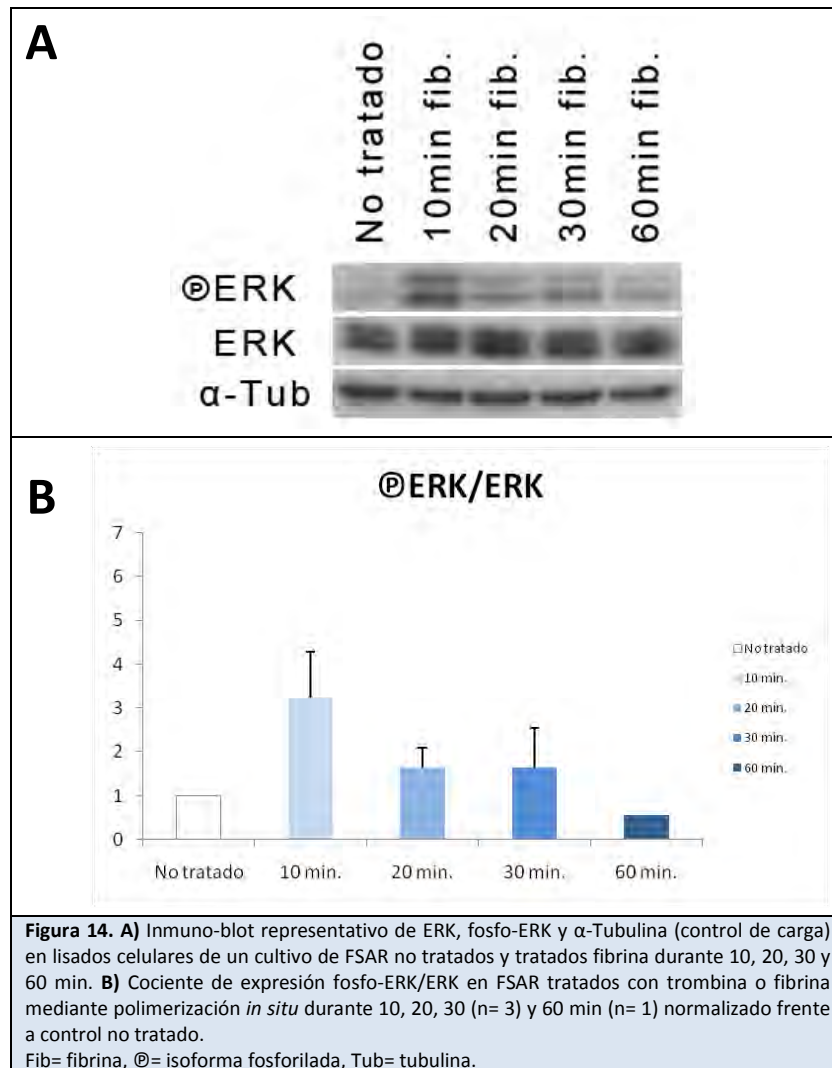


2.2. La incubación con fibrina produce una activación de las quinasa intracelulares activadas por mitógeno en FSAR

Una vez confirmada la activación de NFκB por la fibrina, quisimos comprobar si este efecto venía acompañado a la activación de las MAPK en FSAR. En concreto, estudiamos la activación de ERK y JNK tras periodos cortos de incubación con fibrina.

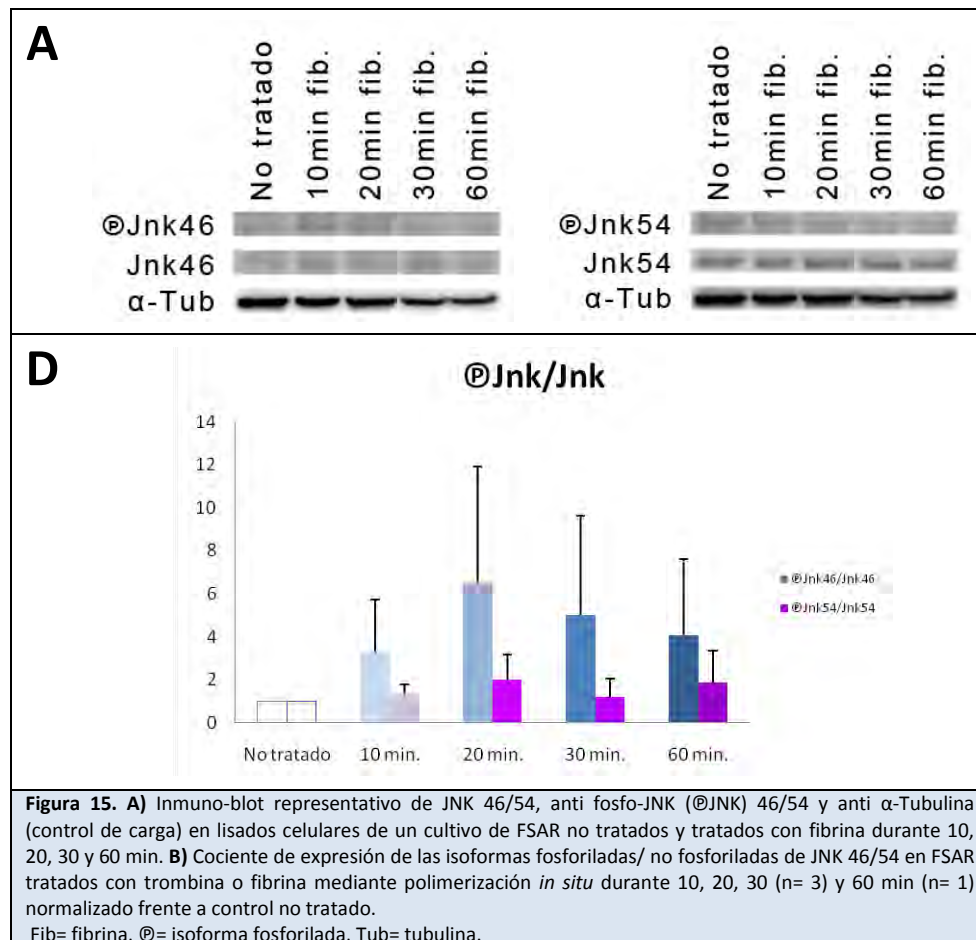
2.2.1. Activación de la quinasa intracelular activada por mitógeno ERK42/44 en FSAR tras incubación con fibrina

Tras 10 min de incubación con fibrina (n= 3), pudimos observar una tendencia al aumento de la forma fosforilada de ERK, que fue descendiendo en los siguientes tiempos de incubación en proporción inversa al aumento progresivo de ERK total (Figura 14).



2.2.2. Activación de la quinasa intracelular activada por mitógeno JNK46/54 en FSAR tras incubación con fibrina

Respecto a JNK (n= 3), el tratamiento con fibrina produjo un incremento en la fosforilación de la subunidad de 46 KDa, que alcanzó un pico a los 20 min de incubación (figura 15).



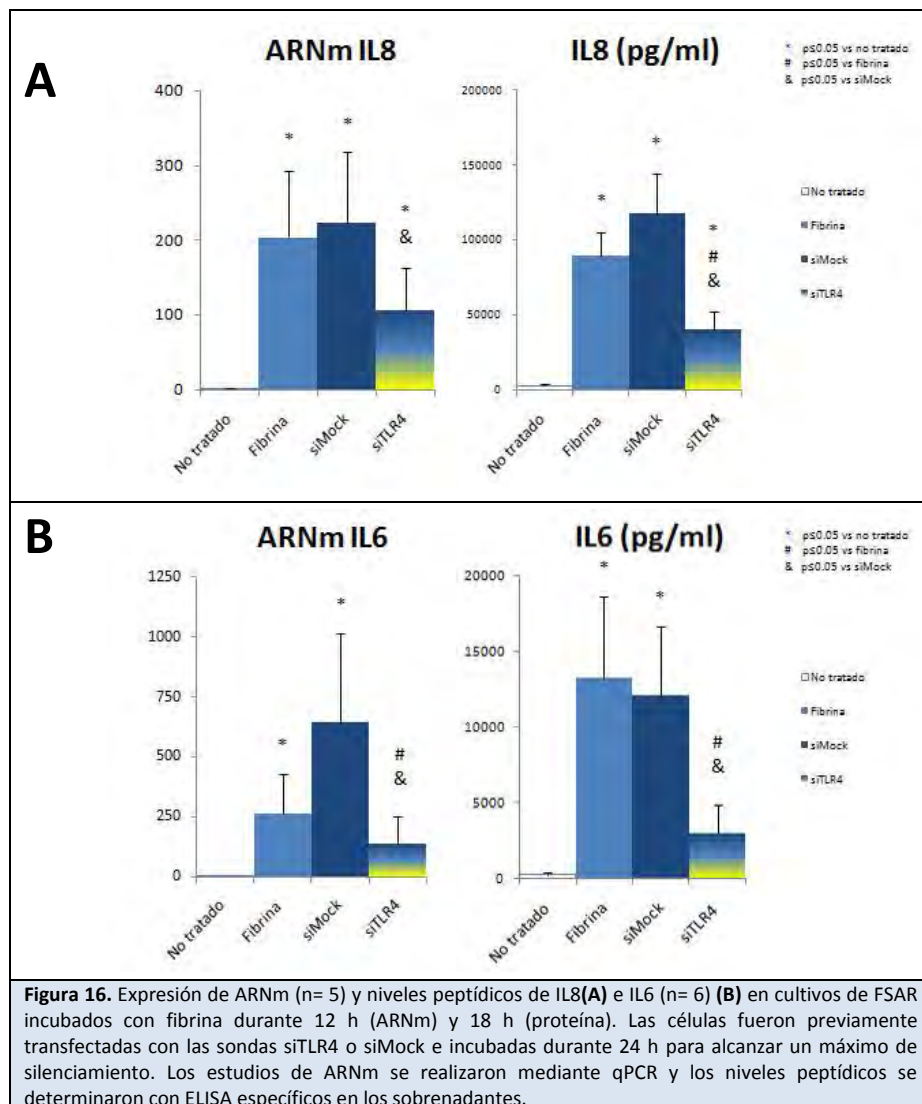
2.3. Estudio de los receptores putativos de fibrina en FSAR, mediante silenciamiento postranscripcional con sondas siRNA

De los diferentes receptores celulares de la fibrina, seleccionamos 3 posibles candidatos a mediar las acciones de esta macromolécula en los FSAR, los receptores TLR4 y TLR2 y la molécula de adhesión ICAM-1. Para estudiar la participación de los receptores TLR2, TLR4 y ICAM-1 en las acciones mediadas por fibrina en FSAR se compararon células con o sin tratar con fibrina y silenciadas frente a los diferentes receptores candidatos (siARN) o secuencia no codificante (Mock siARN). La eficiencia

de cada uno de estos silenciamientos, como se puede observar en el **anexo 2**, fue previamente confirmada.

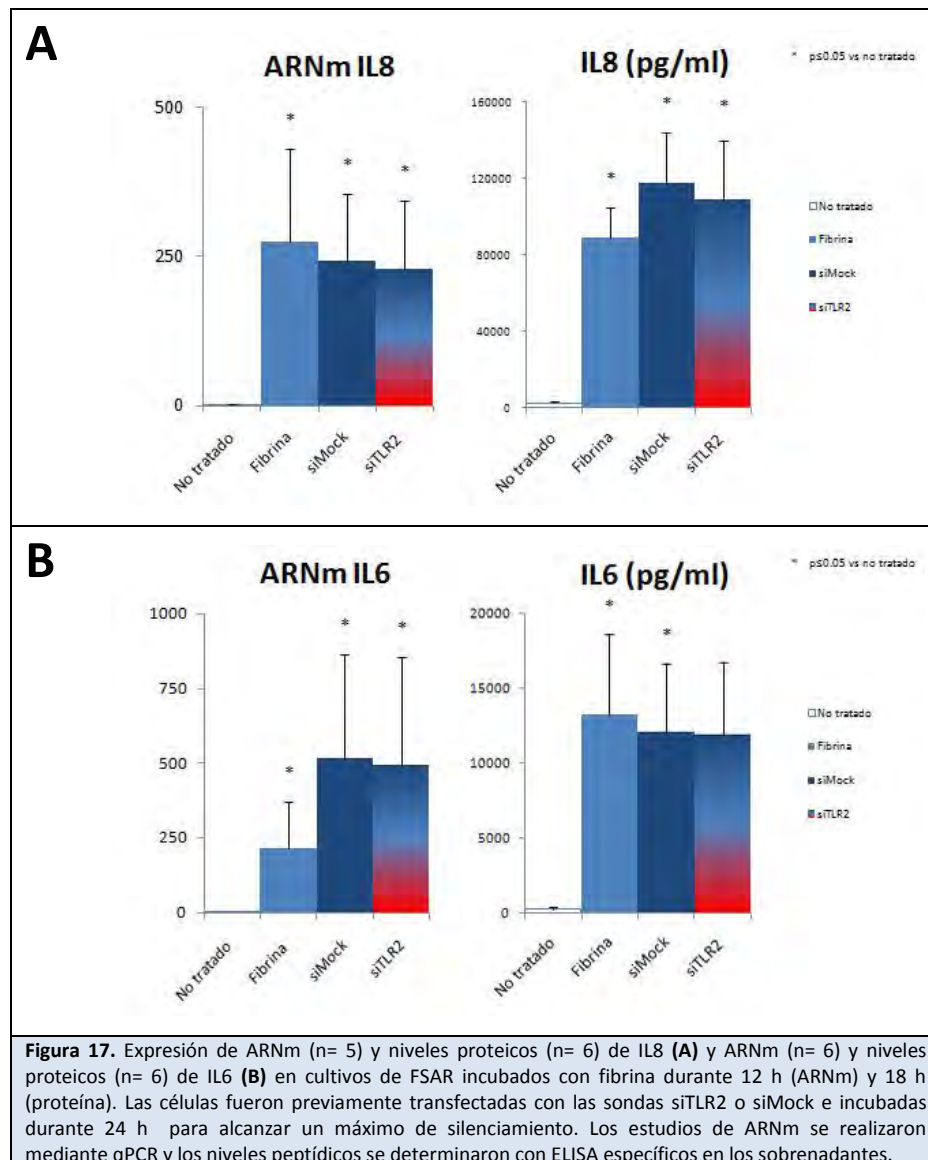
2.3.1. Efecto de la fibrina sobre la inducción de IL8 e IL6 en FSAR tras silenciar TLR4

Los FSAR fueron tratados con TLR4 siARN (siTLR4) o con Mock siARN (siMock) según se detalla en Métodos y en el Anexo 2. A continuación, fueron incubados con fibrina (0.8 mg/ml) polimerizada *in situ* durante 12 h. Las células siTLR4 tuvieron una reducción en los niveles de ARNm de IL8 de un 52% respecto a los FSAR siMock (n= 5; p< 0.05). Por su parte, la expresión génica de IL6 se redujo en un 79% (n= 5; p< 0.05). Estos resultados se confirmaron a nivel proteico, tras 18 h de incubación con fibrina. Los FSAR siTLR4 mostraron una reducción de un 66% en los niveles de IL8 (n= 6; p< 0.05) y un 75% en los de IL6 (n= 6; p< 0.05) en los sobrenadantes de los cultivos (figura 16).



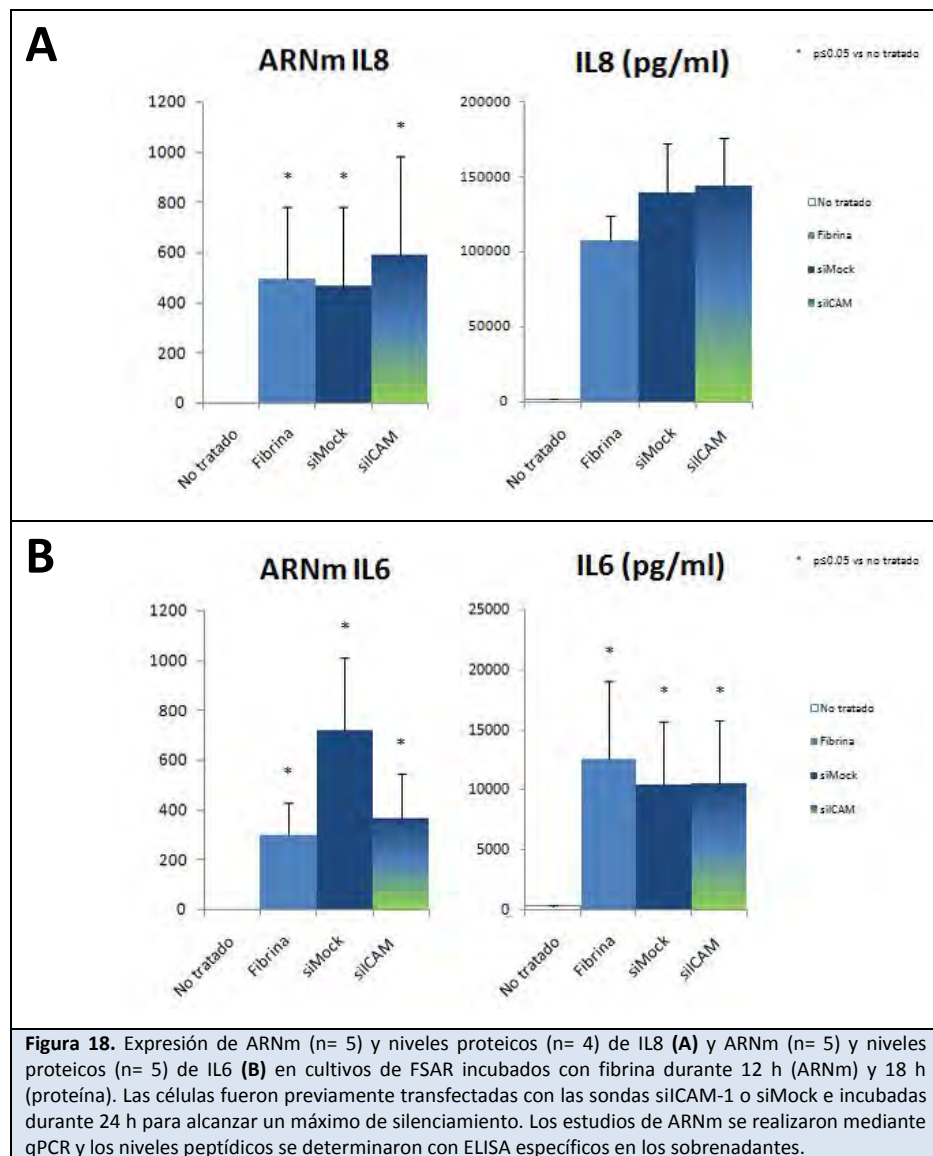
2.3.2. Efecto de la fibrina sobre la inducción de IL8 e IL6 en FSAR tras silenciar TLR2

Los FSAR tratados con TLR2 siARN (siTLR2) o con siMock fueron incubados con fibrina (0.8 mg/ml) polimerizada *in situ*, en iguales condiciones que en el experimento anterior (figura 17). Los niveles de ARNm de IL8 e IL6 así como los peptídicos, no presentaron diferencias significativas entre siTLR2 y siMock.



2.3.3. Efecto de la fibrina sobre la inducción de IL8 e IL6 en FSAR tras silenciar ICAM-1

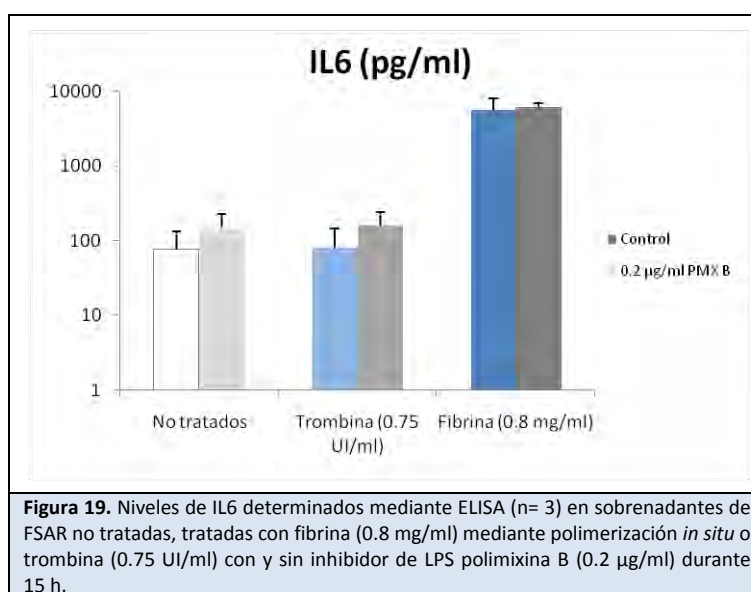
Al igual que lo observado con los FSAR siTLR2, tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos siMock y siICAM-1 ni a nivel de ARNm ni a nivel proteico (figura 18).



2.4. Estudios para descartar contaminación por lipopolisacárido

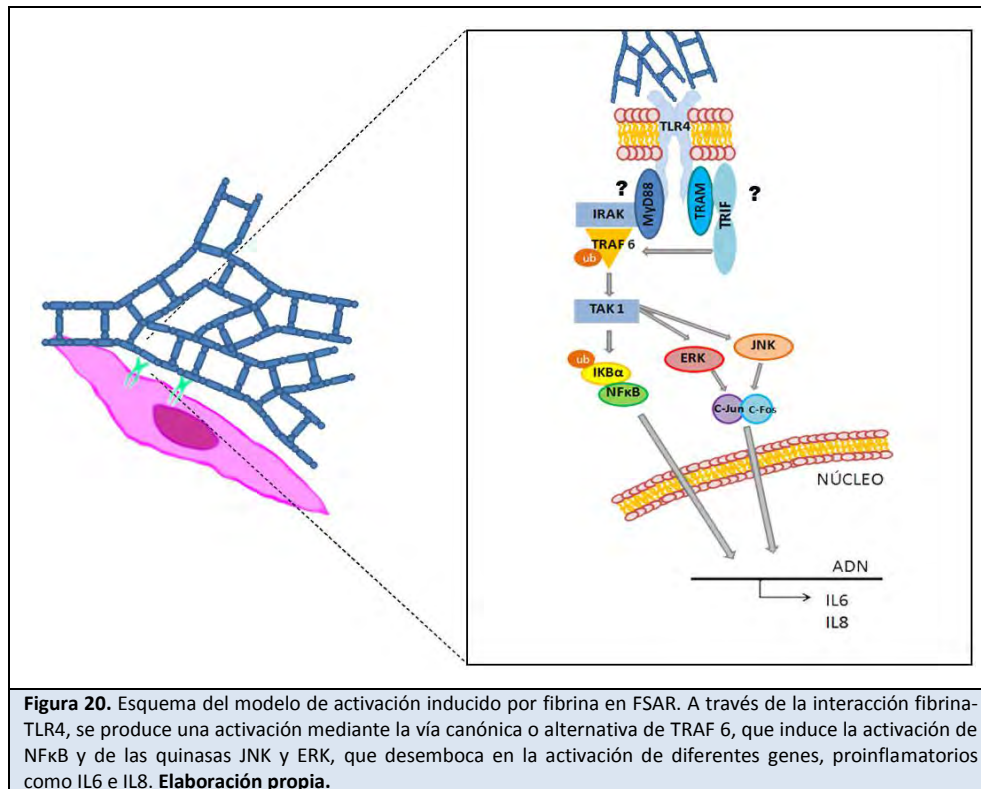
Una de las dificultades de estudiar la activación de TLR4 radica en que esta molécula actúa como receptor para los lipopolisacáridos (LPS) de la pared de bacterias Gram negativas. Aunque el origen del fibrinógeno que empleamos en nuestros experimentos era humano, realizamos experimentos para descartar que una pequeña contaminación por LPS de los reactivos empleados pudiera interferir en nuestras observaciones. Para ello se midieron los niveles de IL6 ($n=3$) mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de FSAR no tratados, tratados con fibrina (0.8 mg/ml) o con trombina (0.75 UI/ml) durante 15 h, en presencia o ausencia del inhibidor de LPS polimixina B (0.2 μ g/ml).

En ningún caso observamos diferencias entre los grupos tratados o no con polimixina (PMX)-B (figura 19).



2.5. Resumen sección 2

En resumen, nuestros datos muestran que la activación de las citoquinas proinflamatorias IL6 e IL8 se produce a través de la acción de NF κ B, proceso en el cual es clave el papel del receptor TLR4. Probablemente participen también las quinasas MAPK ERK y JNK-46, mientras que nuestros datos no apoyan la intervención de los receptores TLR2 ni ICAM-1 en este proceso de activación celular.



3. La citrulinación aumenta el efecto de la fibrina sobre la expresión y síntesis de las citoquinas proinflamatorias

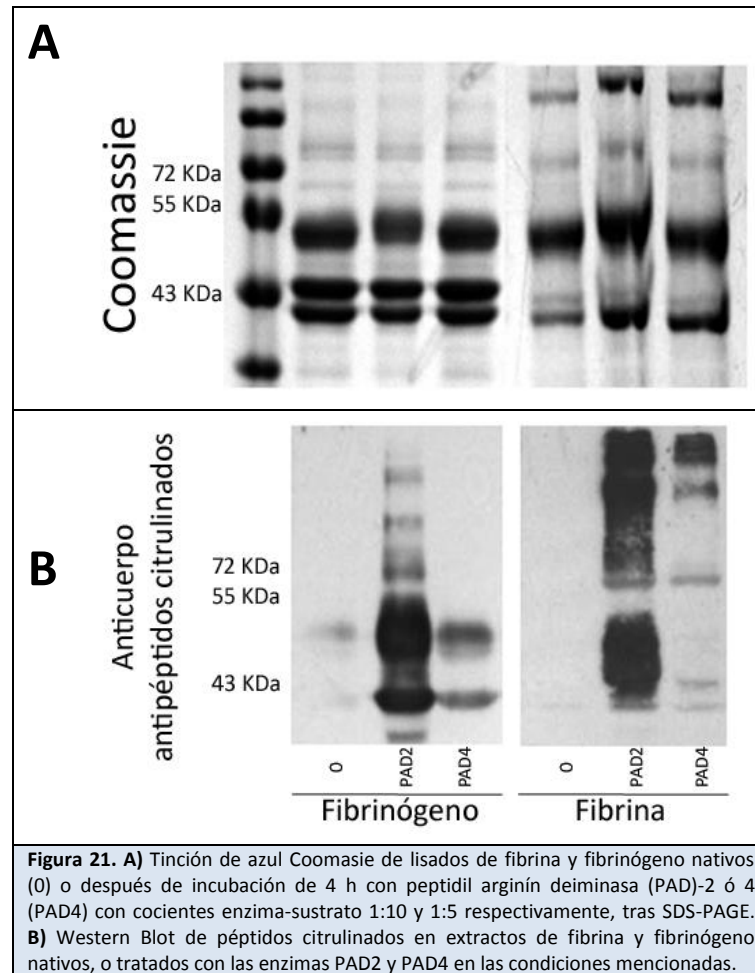
La citrulinación de la fibrina participa en la respuesta inmune humoral observada en los pacientes con AR. Una vez demostrada la actividad inflamatoria de la fibrina en los FSAR, quisimos conocer si su citrulinación podría modificar esta respuesta.

Para desarrollar este objetivo, realizamos estudios comparativos del efecto de la fibrina nativa frente a fibrina citrulinada con las peptidil arginín deiminadas (PAD) responsables de esta modificación *in vivo*. En todos los experimentos, la fibrina nativa fue incubada en presencia de los reactivos de citrulinación, pero sin la adición de PAD (fibrina-sham).

3.1. Eficiencia de la citrulinación de la fibrina con las peptidilarginín deiminadas (PAD) 2 y 4

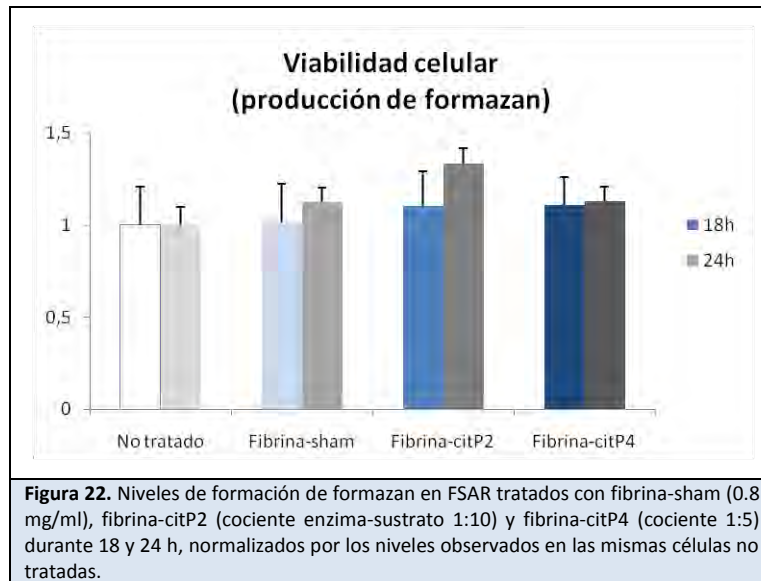
La incubación de la fibrina polimerizada (0.8 mg/ml) con PAD2 (fibrina-citP2) y PAD4 (fibrina-citP4) durante 2, 4 o 15 h, produjo regiones peptídicas enriquecidas en citrulina en las cadenas α y β de la fibrina, consistentes con los datos previamente descritos en la literatura (Vossenaar ER, et al., 2003 et al.). Como se puede observar en la figura 21, la eficiencia óptima de citrulinación se obtuvo tras 4 h de incubación con

18 mg/ml de PAD2 (cociente enzima-sustrato 1:10) y 41 mg/ml de PAD4 (cociente enzima-sustrato 1:5). Estas fueron las condiciones que empleamos a continuación en nuestros experimentos. Cabe destacar que la eficiencia de transformación tanto de la fibrina como del fibrinógeno fue menor en las muestras tratadas con PAD4 que en aquellas tratadas con PAD2.



3.2. Ensayo de viabilidad celular en FSAR incubados con fibrina citrulinada

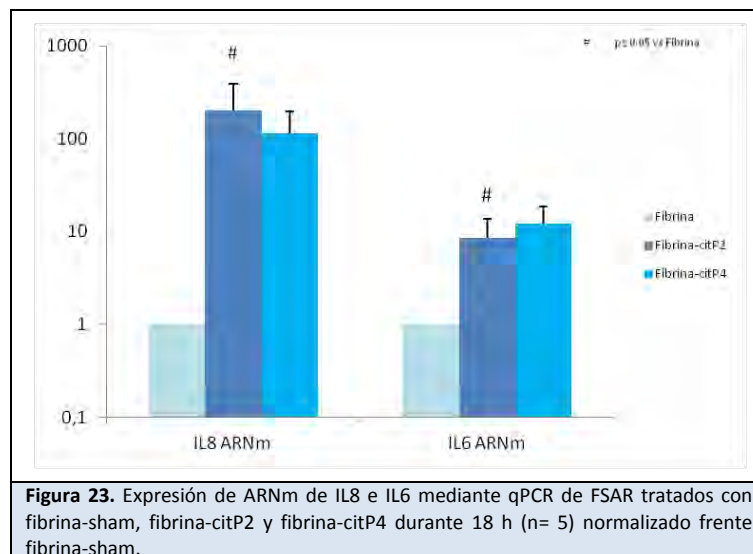
Para asegurar que las condiciones de citrulinación no afectaron a la viabilidad celular, se cuantificó la producción de formazan tras 18 y 24 h de incubación, en células incubadas con fibrina-sham, fibrina-citP2 y fibrina-citP4 (n= 5). El ensayo mostró que la viabilidad de los FSAR no se vio afectada bajo las condiciones de citrulinación, ni a las 18 ni a las 24 h.



3.3. Expresión génica de IL8 e IL6 en FSAR incubados con fibrina citrulinada en comparación con fibrina nativa

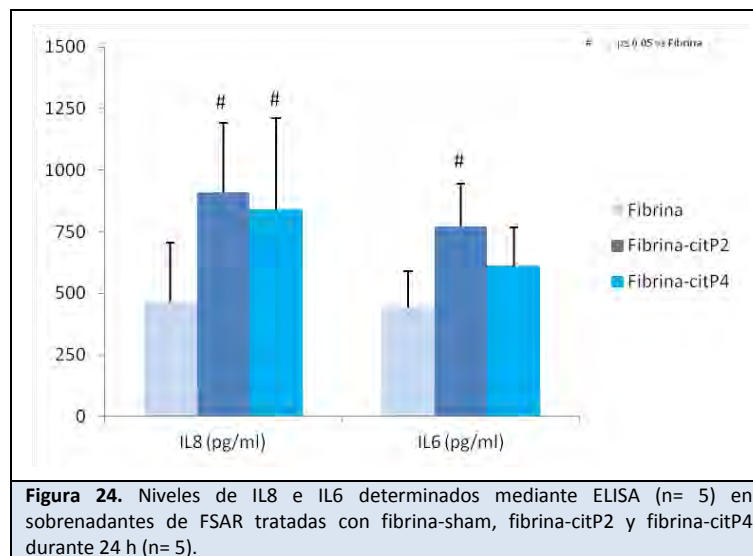
Los FSAR (n= 5) se sembraron sobre matrices de fibrina-sham, fibrina-citP2 o citP4 y se determinaron los niveles de ARNm de IL8 e IL6 tras 18 h de incubación.

Una vez procesadas las muestras, la fibrina-citP2 dio lugar a un gran incremento de los niveles de ARNm de IL8 (n= 5, $p < 0.05$) y de IL6 (n= 5, $p < 0.05$) respecto a la expresión observada en fibrina-sham. La fibrina-citP4 también aumentó la expresión génica de las citoquinas, pero de forma más variable (n= 5, ns).



3.4. Niveles de IL8 e IL6 en los sobrenadantes de FSAR incubados con fibrina citrulinada en comparación con fibrina nativa

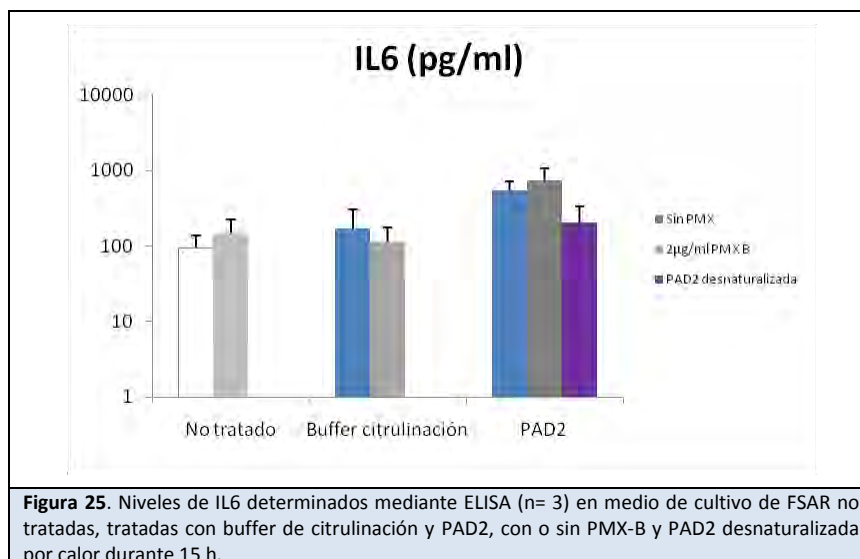
Los niveles de proteína de IL8 e IL6 se determinaron tras 24 h de incubación con fibrina-sham, fibrina-citP2 ó fibrina-citP4. En estos experimentos, los cultivos incubados con fibrina-citP2 mostraron niveles superiores de ambas citoquinas, comparados con fibrina-sham ($n= 5$, $p< 0.05$), mientras que la fibrina-citP4 también dio lugar a un aumento en los niveles de IL8 ($n= 5$, $p< 0.05$).



3.5. Estudios para descartar contaminación por lipopolisacárido del medio y las enzimas citrulinantes

Dado que los enzimas utilizados en estos experimentos son enzimas recombinantes humanas sintetizadas mediante transfección bacteriana, llevamos a cabo experimentos para descartar que el efecto mostrado por la fibrina citrulinada no se debiera a la presencia de trazas contaminantes de LPS. Para esto se cultivaron FSAR ($n= 3$) durante 15 h con los reactivos de citrulinación en presencia o ausencia de PMX B. También realizamos un control con PAD2 desnaturalizada por calor, dado que esta inactivación afecta a su actividad enzimática y no modificaría la presencia de LPS en el medio.

Como puede observarse en la figura 25, se midieron los niveles peptídicos de IL6, sin que se detectaran diferencias significativas en presencia o ausencia de PMX B.



3.6. Resumen sección 3

La adición de enzima PAD2 produjo una mayor cantidad de péptidos citrulinados tanto en la molécula de fibrinógeno como en la de fibrina que la incubación con PAD4, lo que sugiere que probablemente sea esta isoenzima la que contribuye mayoritariamente a la citrulinación de la fibrina *in vivo* en humanos.

La fibrina citrulinada, principalmente por PAD2, fue más potente que la fibrina nativa en la inducción de las citoquinas proinflamatorias en FSAR. Por tanto, esta transformación podría asociarse a una mayor activación en la membrana sinovial en los pacientes con AR.

4. Papel de la fibrina como estímulo proinvasivo para los fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide

Para estudiar la posible contribución de la fibrina en la adquisición del fenotipo invasivo de los FSAR, tratamos de confirmar la inducción por fibrina de varias moléculas detectadas en los estudios de *microarray*. Seleccionamos para ello, PDGF, End 1, Synj 2 y VCAM-1. Además, quisimos explorar si la fibrina podría facilitar la degradación de la matriz extracelular mediada por las metaloproteasas, cuyo papel patogénico en la artritis erosiva es bien conocido.

4.1. Confirmación de la inducción por fibrina de moléculas asociadas al fenotipo invasivo de los FSAR

La expresión de ARNm de PDGF, End1 y Synj2 se estudió tras 12 h de incubación con trombina o fibrina polimerizada *in situ* (n= 4) sin que pudiéramos objetivar cambios significativos en la transcripción de dichas moléculas.

Con respecto a la molécula de adhesión VCAM-1, los niveles de ARNm fueron indetectables en las células no estimuladas en 3 de los 5 cultivos estudiados. En estos 3 casos, la incubación con fibrina fue capaz de inducir su expresión. En contraste, en 2 cultivos de FSAR se observó expresión de VCAM-1 de forma espontánea, sin que la adición de fibrina modificase estos niveles.

4.2. Colocalización de MMP1 y MMP3 con fibrina en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide

Las principales moléculas implicadas en la destrucción tisular en la AR son las MMP. En nuestros estudios de *microarray* no observamos la inducción de ninguna de estas moléculas. Con objeto de evaluar si la presencia de fibrina podría asociarse a una mayor producción de MMP, estudiamos la distribución tisular de la fibrina y las MMP1 y 3 en membranas sinoviales procedentes de pacientes con AR. Como puede apreciarse en la figura 26, la fibrina predominó en la vecindad de la íntima en forma de depósitos sólidos, mayoritariamente acelulares; mientras que las zonas más organizadas aparecieron principalmente en las regiones intersticiales, asociándose a una hiper celularidad y a presencia de inmuno-reactividad en el interior celular. La fibrina se localizó de forma llamativa en los frentes invasivos en contacto con el hueso y el cartílago.

A continuación, estudiamos la distribución de MMP1 y MMP3 en cortes seriados de los mismos tejidos, de forma aislada o en combinación con fibrina, usando tinciones dobles. La reactividad hacia ambas MMPs fue alta en estos tejidos, apareciendo la MMP1 principalmente en el interior celular, mientras MMP3 predominó en localización extracelular. Ambas proteasas se localizaron de forma abundante en los frentes de erosión. Figura 26.

En los estudios de doble tinción, la inmunoreactividad intersticial a ambas MMP se asoció con los depósitos de fibrina. Además, tanto las dos MMP como la fibrina, se presentaron principalmente en los frentes de invasión. Por otro lado, los FSAR de las regiones ricas en fibrina mostraron una alta reactividad a MMP1 y MMP3. En conjunto,

estos datos indican que las regiones ricas en fibrina se corresponden con sitios de mayor actividad proteolítica en las articulaciones.

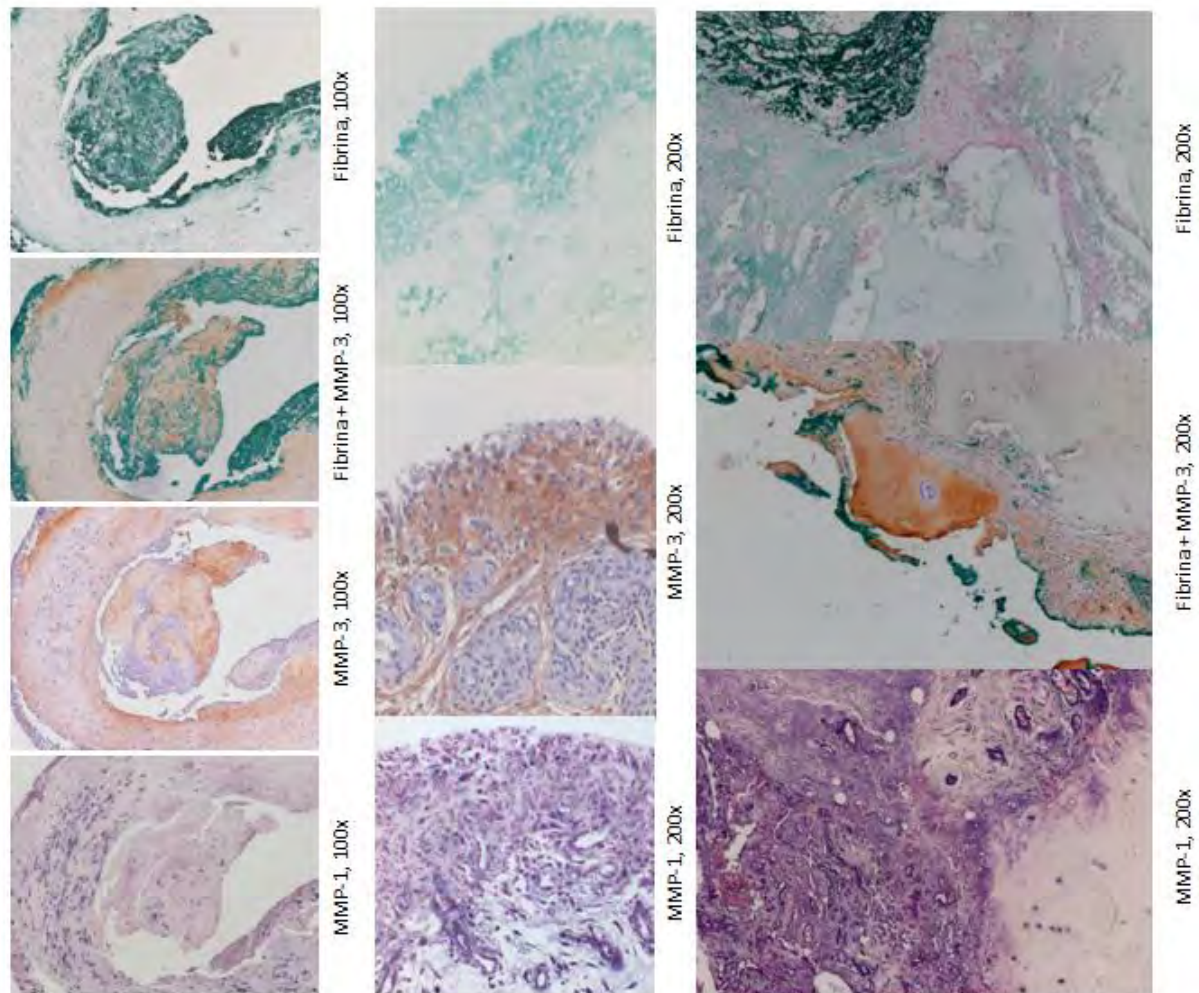
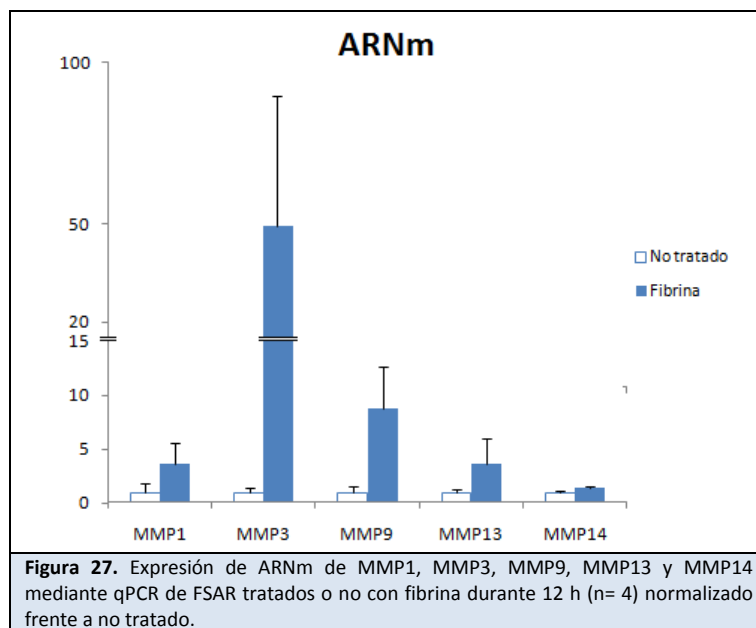


Figura 26. Inmuno-histoquímica de membrana sinovial procedente de pacientes AR incubado con anticuerpos anti MMP3, anti MMP1 y anti fibrina (fibrinógeno). El factor de amplificación se muestra a la derecha. Se muestran zonas ricas en fibrina (verde) y la presencia de MMP3 extracelular (marrón) e inmuno-reactividad frente a MMP1 de predominio intracelular (violeta) en las mismas áreas, a bajo aumento (izda.), en detalle (centro) y en zonas de invasión de hueso y cartílago (derecha).

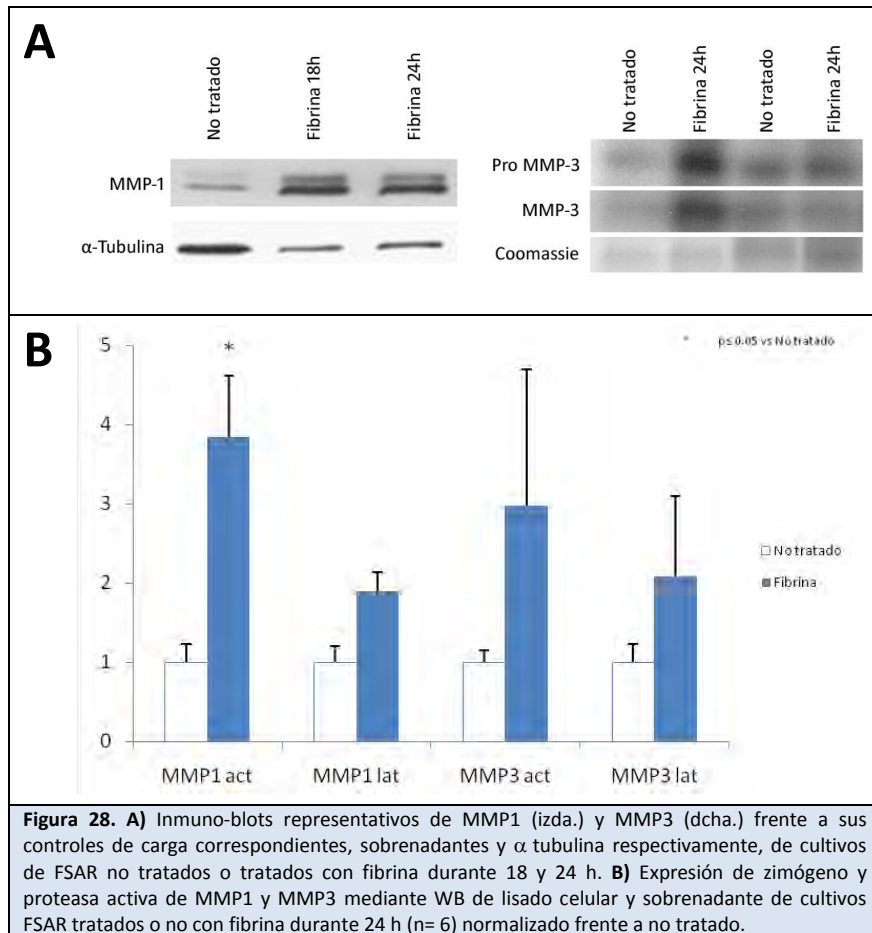
4.3. Expresión génica de las metaloproteinasas MMP1, MMP3, MMP9, MMP13 y MMP14 en FSAR incubados con fibrina

Tras 12 h de incubación con fibrina (n= 4), observamos una tendencia al aumento de los niveles de expresión génica de MMP1, MMP3 y MMP9 de unas 4, 50 y 9 veces respectivamente, aunque no se alcanzó significación estadística (figura 27). Por el contrario, no observamos modificaciones en la expresión de MMP13 ni de MMP14.



4.4. Detección proteica de MMP1 y MMP3 en sus formas latente y activa tras incubación de los FSAR con fibrina

Dado que la función de las MMP está sometida a una estrecha regulación transcripcional y postranscripcional estudiamos a continuación la posible relación entre la presencia de fibrina y la activación de MMP1 y de MMP3. Tras 18 y 24 h de estimulación con fibrina se midieron los niveles de proteína en los extractos celulares y en los sobrenadantes. A las 24 h de incubación con fibrina se observó un incremento de 4 veces en la MMP1 activa a nivel intracelular (n= 6, $p < 0.05$) (figura 28); por su parte, la MMP3 activa aumentó tras incubación con fibrina en los sobrenadantes de 3 de los 6 cultivos de FSAR estudiados (ns) (figura 28).



4.5. Resumen sección 4

Algunas moléculas identificadas en el transcriptoma de la fibrina en FSAR se asocian a invasividad celular, pero nuestros estudios no han logrado confirmar su relación con la fibrina. La inducción de la molécula VCAM-1 en varios cultivos sugiere la existencia de un mecanismo proinvasivo diferencial de la fibrina en diferentes subtipos de la enfermedad, aunque es necesario realizar más estudios para extraer conclusiones consistentes.

Por otra parte, la fibrina favorece la expresión de las proteasas MMP1, MMP3 y MMP9 por los fibroblastos sinoviales y se asocia a las MMP en los frentes de invasión lo que sugiere su participación activa en el daño articular.

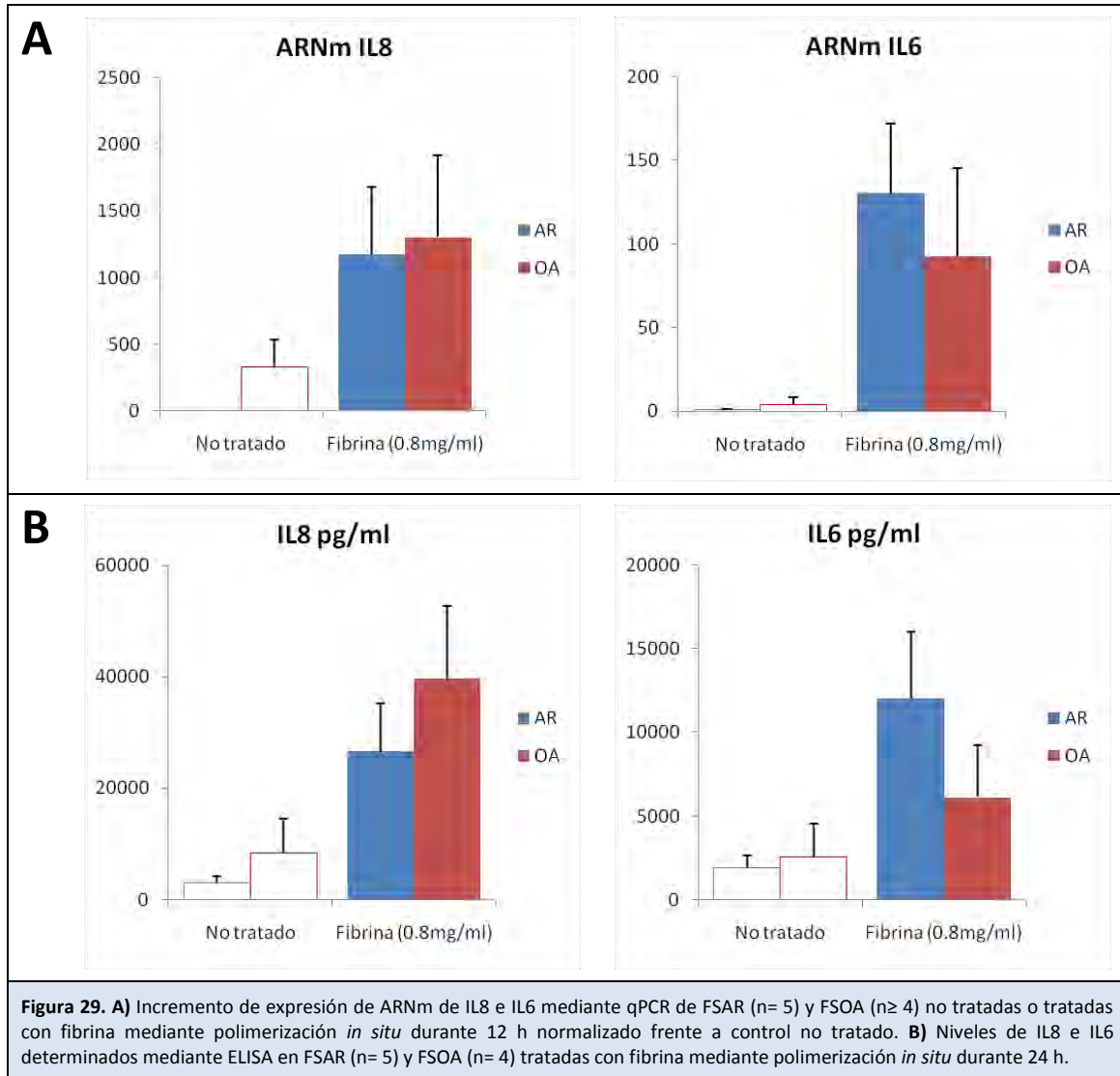
5. Comparación en la respuesta celular a la fibrina entre pacientes con artritis reumatoide y artrosis

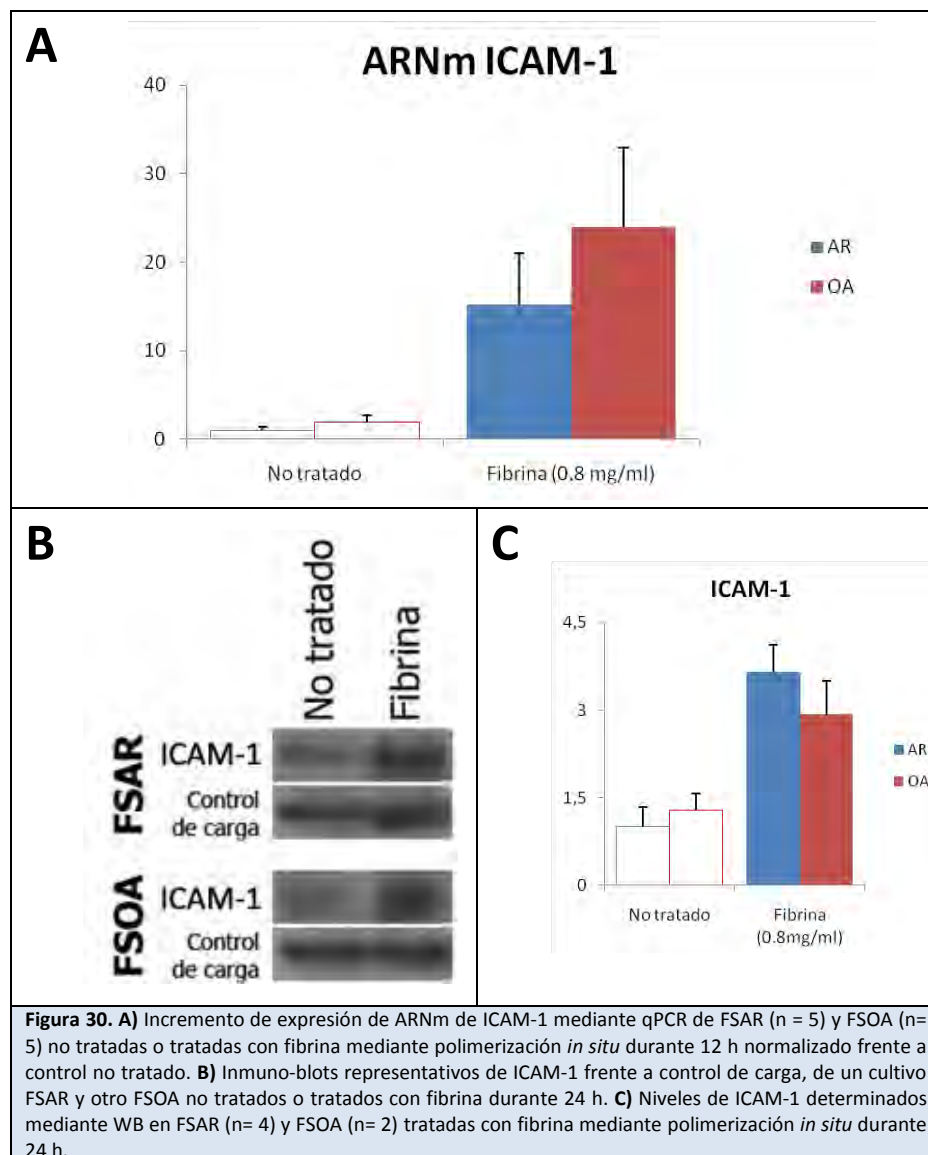
Se ha sugerido que los FSAR presentan alteraciones intrínsecas que podrían justificar una mayor reactividad a factores del microambiente tisular. Por este motivo,

quisimos comparar el efecto de la fibrina en células de pacientes con AR y con OA sometidos a recambio protésico.

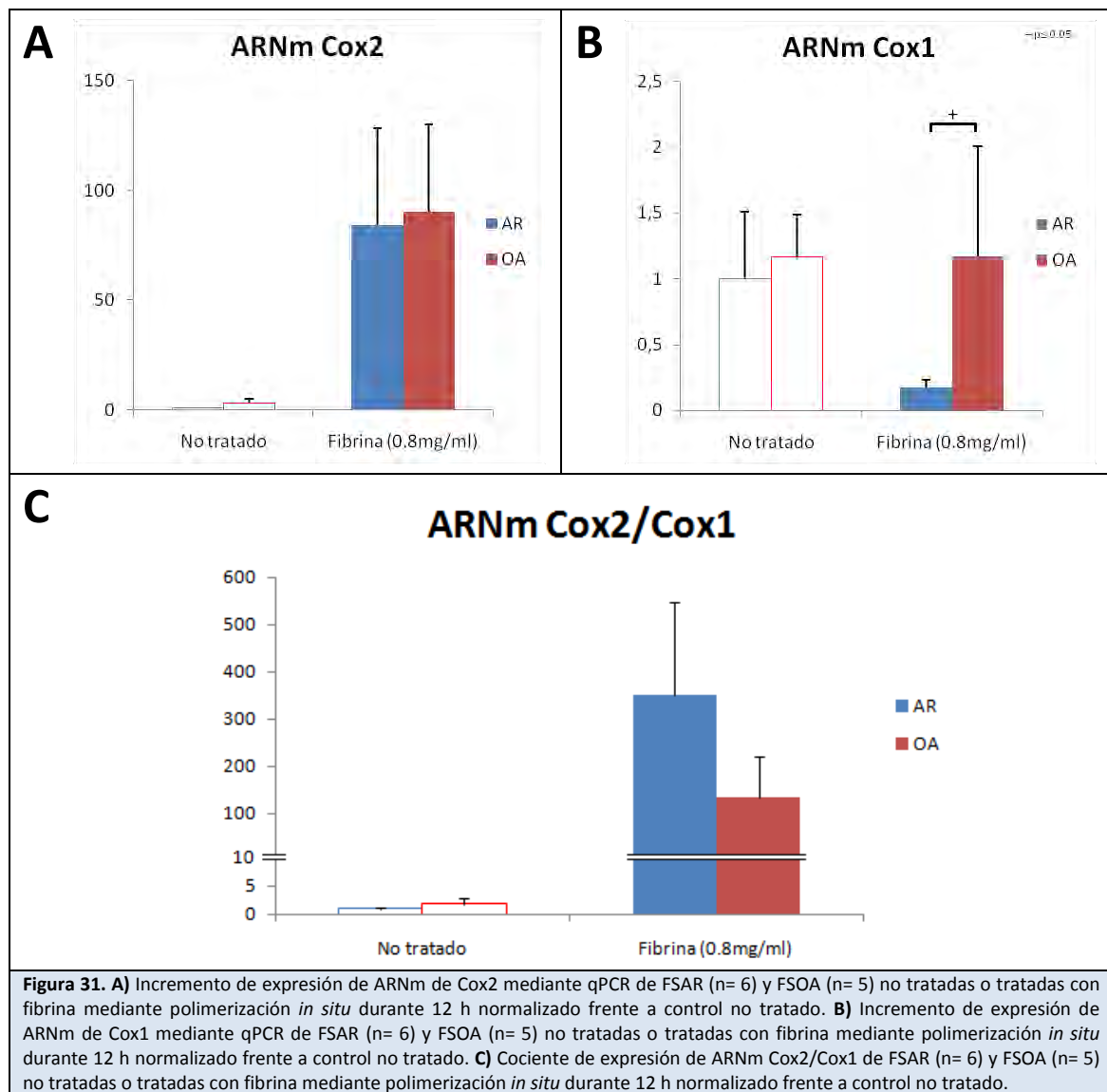
5.1. Comparación de la inducción de moléculas proinflamatorias por la fibrina en FSAR y FSOA

No observamos diferencias significativas entre FSAR y FSOA en la expresión de ARNm y proteína de IL8, IL6 (figura 29) e ICAM-1 (figura 30) inducida por fibrina.

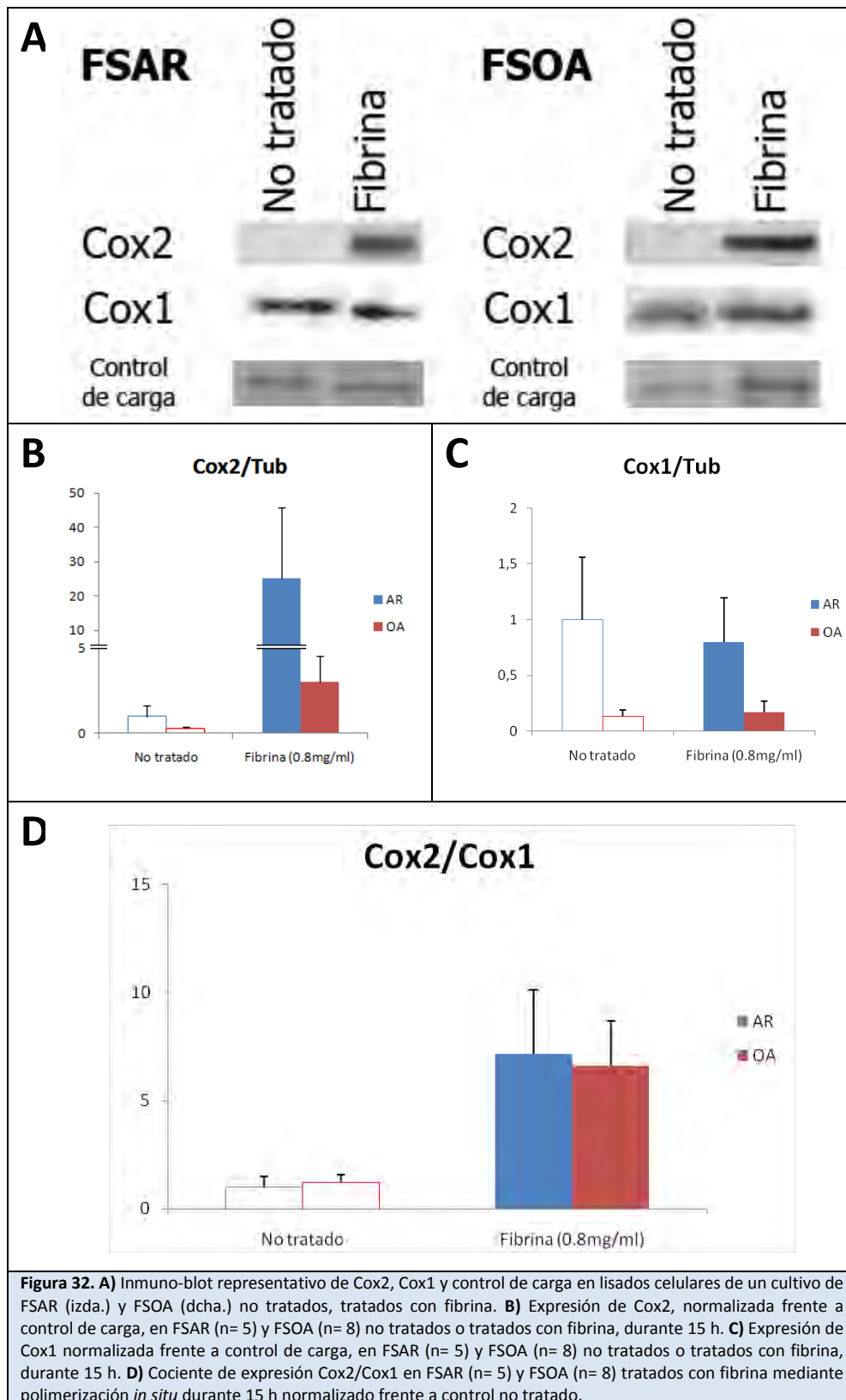




Como se puede apreciar en la figura 31, la incubación con fibrina produjo un efecto similar sobre la expresión de ARNm de Cox2 en FSAR (n= 6) y FSOA (n= 5) frente a sus respectivos controles no tratados, mientras que produjo una inhibición en la expresión de Cox1 en FSAR de un 85% frente a FSOA ($p \leq 0.05$). En consecuencia, el cociente Cox2/Cox1 fue 2.5 veces mayor en FSAR (ns).

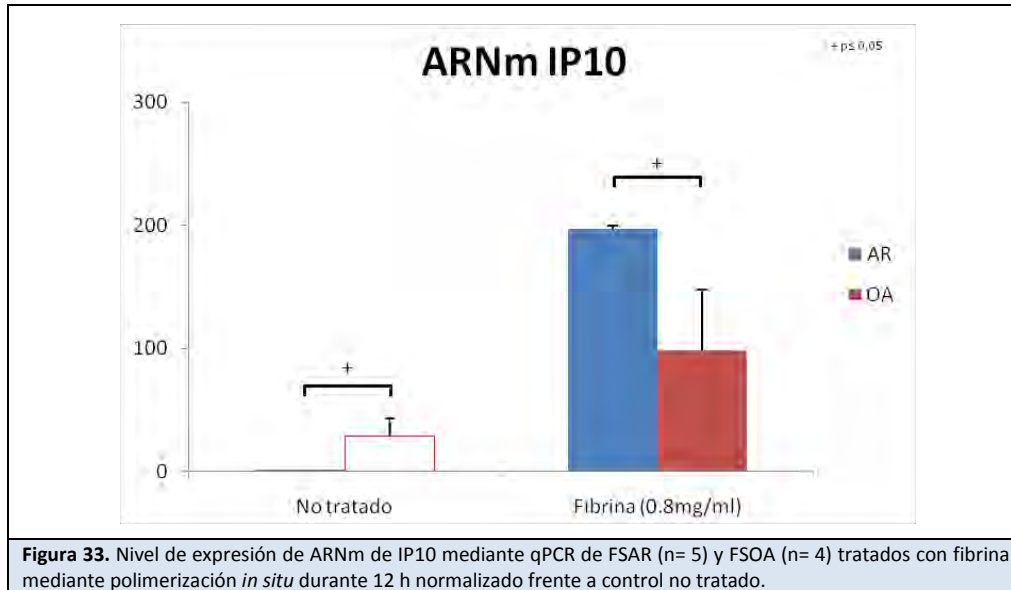


En cuanto a nivel proteico (figura 32), no se observaron diferencias significativas entre FSAR (n= 5) y FSOA (n= 8), en ninguno de los casos, aunque se siguió observando una ligera tendencia a la disminución de Cox1 en FSAR.

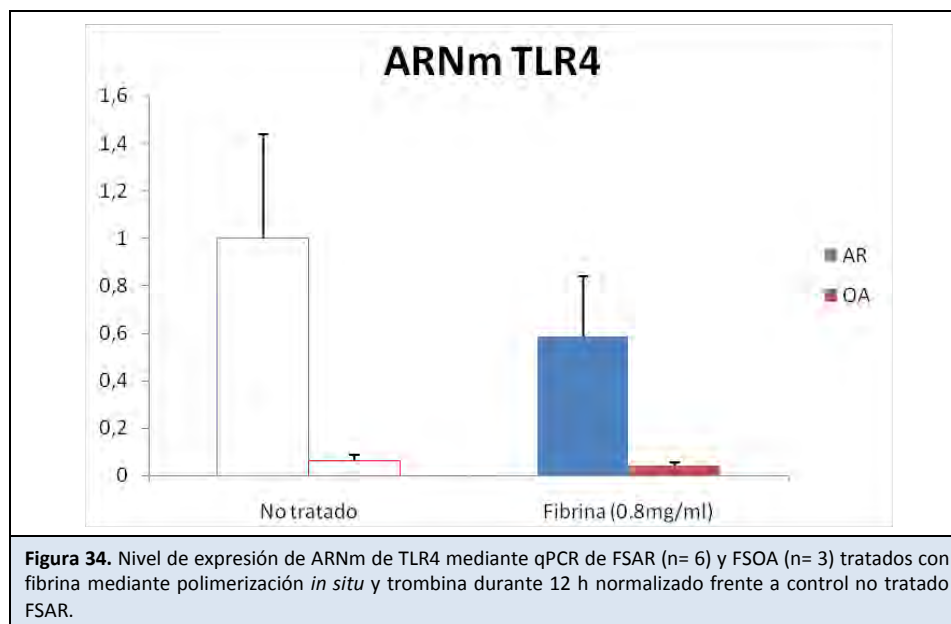


Comparamos también la expresión génica de IP10 entre ambas entidades (figura 33). Esta molécula resultó estar suprimida en los FSAR (n= 6), respecto a los FSOA (n= 4), los cuales mostraban niveles 30 veces superiores en condiciones

basales ($p < 0.05$). Tras la estimulación con fibrina, los FSAR presentaron un gran aumento en la expresión de IP10 ($p < 0.05$), que no se observó en los FSOA.

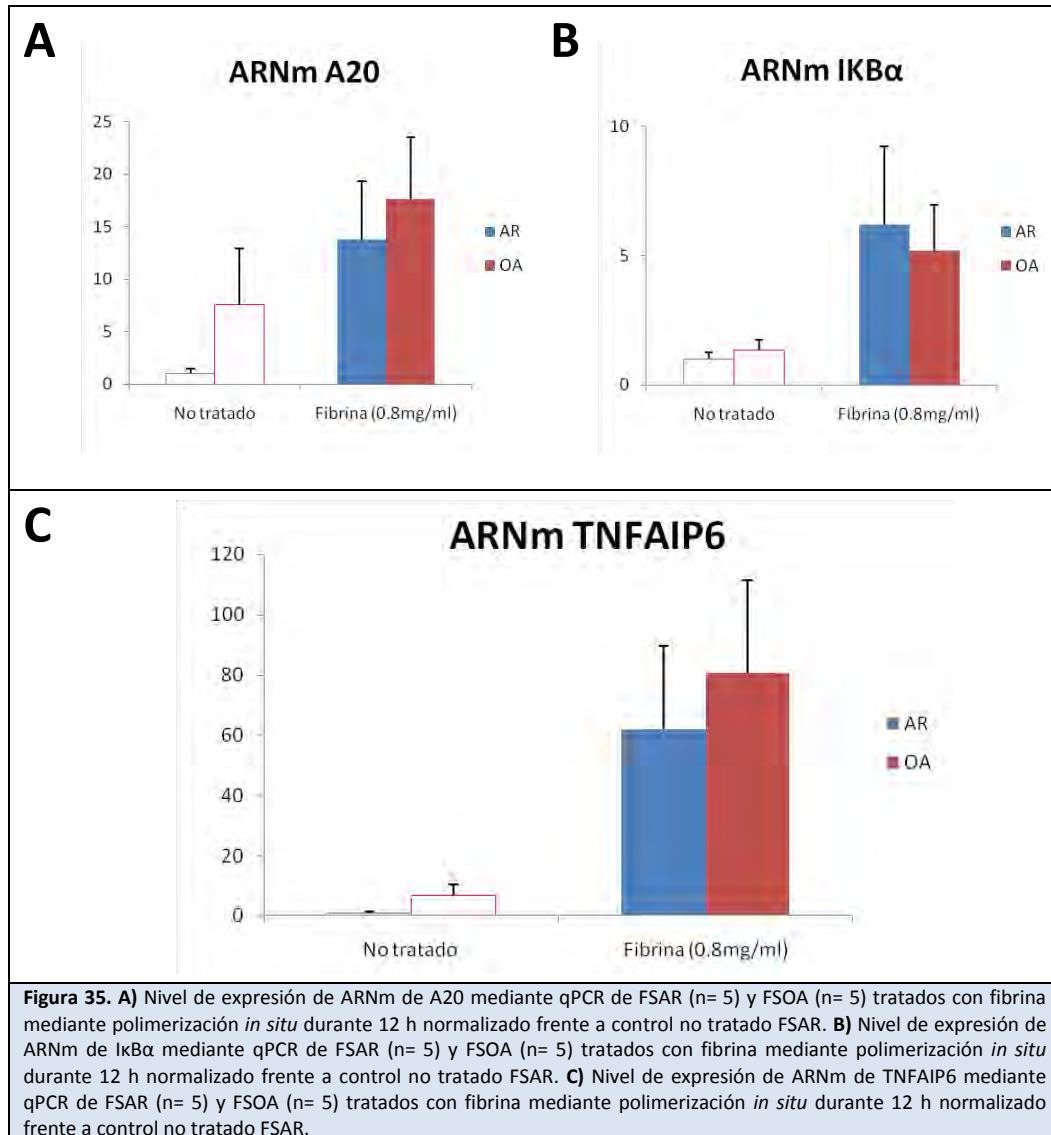


Según nuestros resultados previos, el receptor TLR4 es fundamental en vehicular las acciones de la fibrina en los FS. En comparación con los FSOA, los FSAR mostraron una sobreexpresión de este receptor en condiciones basales, ya que los niveles de ARNm fueron unas 15 veces superiores en los FSAR (n= 6) respecto a los FSOA (n= 3). La adición de fibrina no pareció mostrar cambios apreciables en los niveles del receptor, entre FSAR y FSOA. Figura 34.



5.2. Comparación de la inducción de moléculas reguladoras por la fibrina en FSAR y FSOA

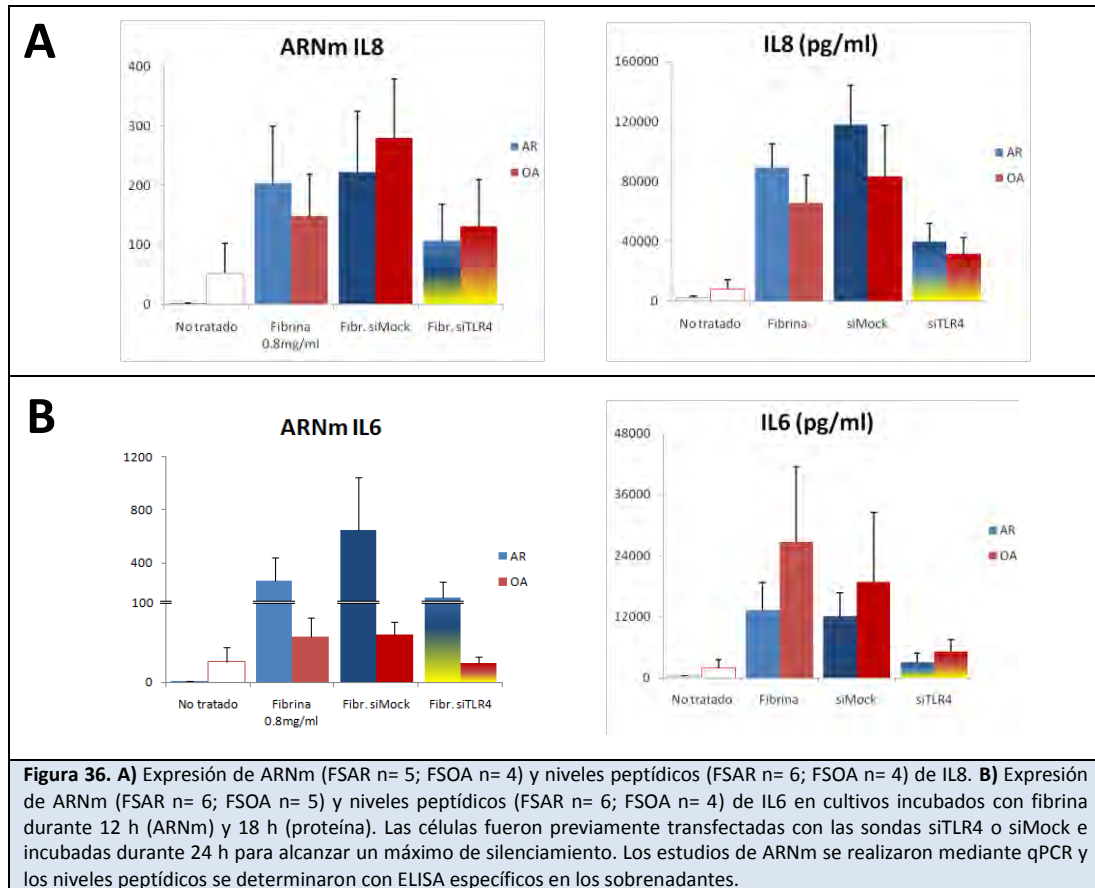
Al comparar la estimulación mediada por fibrina entre FSOA y FSAR (n= 5) en los niveles de expresión de ARNm de A20, IKB α y TNFAIP6 (Figura 35), tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos.



5.3. Comparación del efecto de la fibrina sobre la inducción de IL8 e IL6 tras silenciar TLR4 en FSAR y FSOA

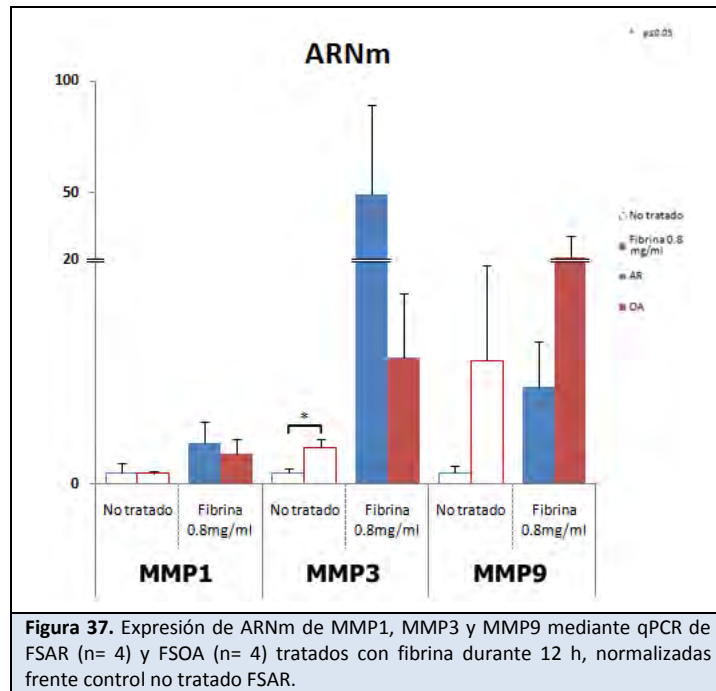
Al comparar el efecto del silenciamiento del receptor TLR4 en la estimulación de IL8 e IL6 mediada por fibrina entre FSOA y FSAR (figura 36) los niveles de

expresión de ARNm (FSAR $n \geq 5$; FSOA $n \geq 4$) y de proteínas (FSAR $n = 6$; FSOA $n = 4$) de ambas moléculas, no presentaron diferencias significativas.



5.4. Comparación del efecto de la inducción de moléculas asociadas al fenotipo invasivo por la fibrina en FSAR y FSOA

Al comparar la estimulación del ARNm de MMP1, 3 y 9 (figura 37) mediada por fibrina entre FSOA ($n = 4$) y FSAR ($n = 4$), se observó una tendencia similar entre ambas poblaciones. Los FSOA no estimulados mostraron una mayor expresión génica de MMP3 ($p < 0.05$ vs los FSAR, $n = 4$) sin que se apreciaran efectos sobre estos niveles con la adición de fibrina.



5.5. Resumen sección 5

Estos estudios muestran que el proceso de inducción de la fibrina los FS no es específico de los pacientes con AR. Sin embargo, los FSAR podrían ser más sensibles a las acciones de la fibrina *in vivo*, debido a que tienen una mayor expresión del receptor TLR4 en condiciones basales.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

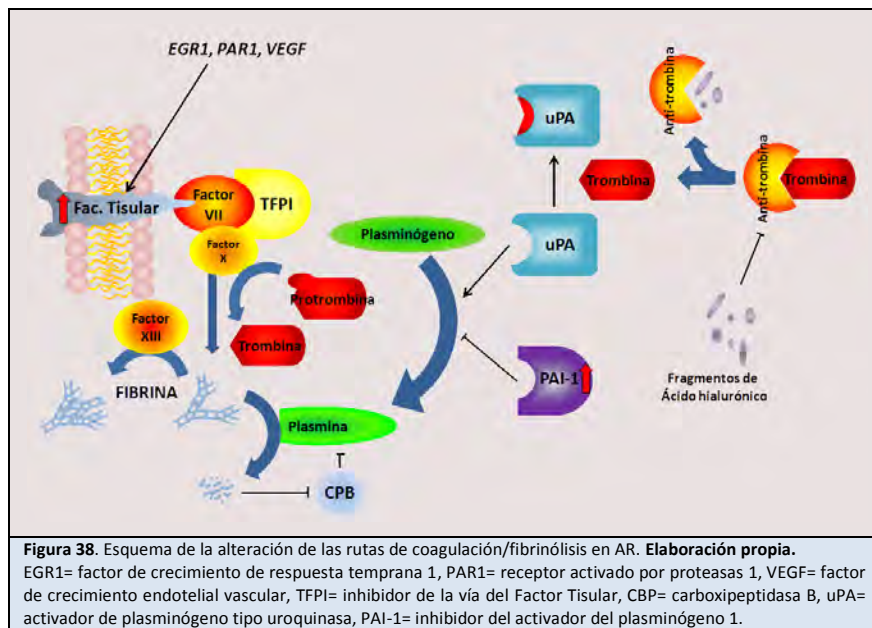
1. Efecto inducido por fibrina en células sinoviales reumatoides

Históricamente, la fibrina acumulada en la membrana sinovial de los pacientes con AR, así como en diferentes modelos experimentales, fue interpretada como un reflejo del ambiente proinflamatorio de la membrana sinovial. En ese contexto, a menudo se ha identificado con la noción de daño sinovial terminal. Sin embargo, el papel de la fibrina como agente perpetuador fue adquiriendo mayor protagonismo en relación con la trombofilia extraarticular característica de la patología. Posteriormente, y principalmente tras el descubrimiento de la citrulinación y de su significado en la AR, la fibrina es estudiada como uno de los principales autoantígenos de la enfermedad. El posible papel como estímulo de la reacción inflamatoria sinovial que lleva a la producción de las citoquinas pivotaes de la enfermedad no se había abordado hasta la actualidad (Salvi R, et al., 2000 [w/](#)) (Andersen RB y Gormsen J, 1970 [w/](#)) (Ichikawa Y, et al., 1997 [w/](#)) (Bloom BJ, et al., 1998 [w/](#)) (Chapuy-Regaud S, et al., 2005 [w/](#)) (Sanchez-Pernaute O, et al., 2003a [w/](#)) (Takizawa Y, et al., 2006 [w/](#)) (Raijmakers R, et al., 2012 [w/](#)) (Trouw LA, et al., 2009 [w/](#)).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se ha demostrado el efecto proinflamatorio de la fibrina en los FSAR, a través de la unión al receptor de la inmunidad innata TLR4 y la consiguiente activación de diferentes citoquinas entre las que destacamos IL6 e IL8. También hemos podido observar cómo la citrulinación amplifica el efecto proinflamatorio de la fibrina en los FSAR. Por otra parte, nuestros resultados indican que los depósitos de fibrina favorecen la producción de MMPs implicadas directamente en la degradación e invasividad por parte de los FSAR del tejido óseo y cartilaginoso adyacente.

Nuestros hallazgos apoyan que uno de los aspectos clave del papel de la fibrina en la patogenia de la enfermedad es, precisamente, el ambiente procoagulante en las articulaciones de los pacientes. La figura 38, resume las principales alteraciones descritas en los procesos tisulares de fibrinogénesis/fibrinolisis. En particular, las articulaciones de los pacientes se caracterizan por un aumento de factor tisular, de fragmentos de la MEC, del inhibidor de activador del plasminógeno (PAI)-I y de la carboxipeptidasa B (CBP) (Mechtcheriakova D, et al., 1999 [w/](#)) (Alm AK, et al., 1999 [w/](#)) (Yan SF, et al., 1998 [w/](#)) (Song JJ, et al., 2011 [w/](#)) (Salvi R, et al., 2000 [w/](#)), dos de los cuales aparecen sobreexpresados en nuestros resultados de *microarray*: PAI-1 y

Factor tisular. Brevemente, el factor tisular tiene un papel en iniciar la vía extrínseca de la hemostasia en respuesta a mediadores inflamatorios y los fragmentos de la MEC tienen capacidad para inhibir a antitrombina (Chang X, et al., 2005c w/; 2005d w/), ambas contribuyendo a la estimulación de la fibrinogénesis. Por otro lado, los fragmentos de la MEC son también capaces de inhibir al activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPA) (Braat EA, et al., 2000 w/) esto junto a la activación de PAI-1 y CBP, todas implicadas en la activación del plasminógeno, sugieren un déficit en degradación constitutiva de la fibrina.



La activación de la hemostasia y el aumento de trombina en el espacio articular podrían ser responsables directos de diferentes acciones celulares a través de los receptores activados por proteasas (PARs). Estos se expresan en la superficie de los condrocitos y de los fibroblastos sinoviales, y pueden inducir la expresión de algunas citoquinas, incluyendo IL6 e IL8, como se ha observado en diferentes células, incluyendo los fibroblastos sinoviales (Huang CY, et al., 2013 w/) (Furuhashi I, et al., 2008 w/) (Take Y, et al., 2009 w/) (Chiu YC, et al., 2008 w/) (Lin CH, et al., 2006 w/). Sin embargo, nuestros experimentos demostraron que el efecto proinflamatorio era debido a la fibrina y no a la presencia de trombina en las mallas. En consonancia con nuestros resultados, Qui J y colaboradores en 1997 w/, demostraron la especificidad de la fibrina frente a trombina y fibrinógeno en la inducción de IL8 en células vasculares endoteliales.

El fibrinógeno y la fibrina son elementos de la MEC cuya función principal es dar soporte a las células, favoreciendo la locomoción, la adhesión, la proliferación y la supervivencia. Estas acciones son fundamentales en los procesos de reparación de

heridas y en facilitar la migración de los leucocitos a través de la pared de los vasos. Estas macromoléculas también tienen un papel en algunas situaciones patológicas, como el crecimiento tumoral (Yakovlev S, et al., 2014 [w/](#)) (Rybarczyk BJ, et al., 2003 [w/](#)) (Naito M, 2000 [w/](#)) (Chiron S, et al., 2012 [w/](#)) (Gerard C, et al., 2011 [w/](#)) (Nomura H, et al., 1999 [w/](#)) (Hayen W, et al., 1999 [w/](#)) (Palumbo JS, et al., 2000 [w/](#); 2005 [w/](#)). Las redes de fibrina tienen acciones indirectas, proporcionando sitios específicos de unión para factores de crecimiento, como VEGF y FGF-2. El anclaje de estos péptidos prolonga su tiempo de actuación y regula su distribución (Sahni A, et al., 1998 [w/](#); 2000 [w/](#)). Del mismo modo, la fibrina tiene múltiples dominios de unión a otras MEC, proteasas y células, y a través de estos últimos puede ejercer efectos directos sobre el metabolismo celular (Naito M, 2000 [w/](#)) (Smiley ST, et al., 2001 [w/](#)) (Szaba FM y Smiley ST, 2002 [w/](#)).

Estas acciones nos impulsaron a plantear la interacción de la fibrina con los fibroblastos sinoviales, y a exportar a la artritis el sistema de interacción *in vitro* entre fibrina y monocapas celulares.

En la mayoría de los experimentos que hemos realizado, fibrina y fibrinógeno mostraron un perfil de efectos similares. La principal diferencia fue la magnitud del efecto, mucho más notorio en el caso de la fibrina. Este hecho ha sido descrito también en monocitos/macrófagos y polimorfonucleares. Posiblemente, la fibrina induce respuestas celulares más potentes debido a su capacidad de mantener uniones más estables y fuertes que el fibrinógeno en las diferentes células con las que interacciona. Las fuerzas tensiles generadas en las mallas de fibrina pueden activar, además, la señalización a través de diferentes moléculas de adhesión (Shainoff JR, et al., 1990 [w/](#)) (Zhang P, et al., 2010 [w/](#)) (Yakovlev S, et al., 2014 [w/](#)) (Sahni A y Francis CW, 2000 [w/](#)) (Qi J, et al., 1997 [w/](#)).

Los estudios de transcripción de genoma completo nos permitieron predecir la ruta de señalización dependiente de la fibrina en los fibroblastos sinoviales. Así, como se puede observar en las figuras 39.1 y 39.2, gran parte de las moléculas inducidas por fibrina estaban implicadas en la señalización o eran activadas en respuesta a NFκB (Gilmore Lab, 2011 [w/](#)). Estos datos concordaban con estudios previos (Liu X y Piela-Smith TH, 2000 [w/](#)). En los siguientes experimentos, pudimos confirmar que el contacto con la fibrina produce una activación del NFκB en FSAR. Estos hallazgos sitúan a la fibrina en un estadio precoz en la cadena de mecanismos patogénicos de la AR, corriente arriba de las citoquinas patogénicas de las que el NFκB es el principal regulador transcripcional.

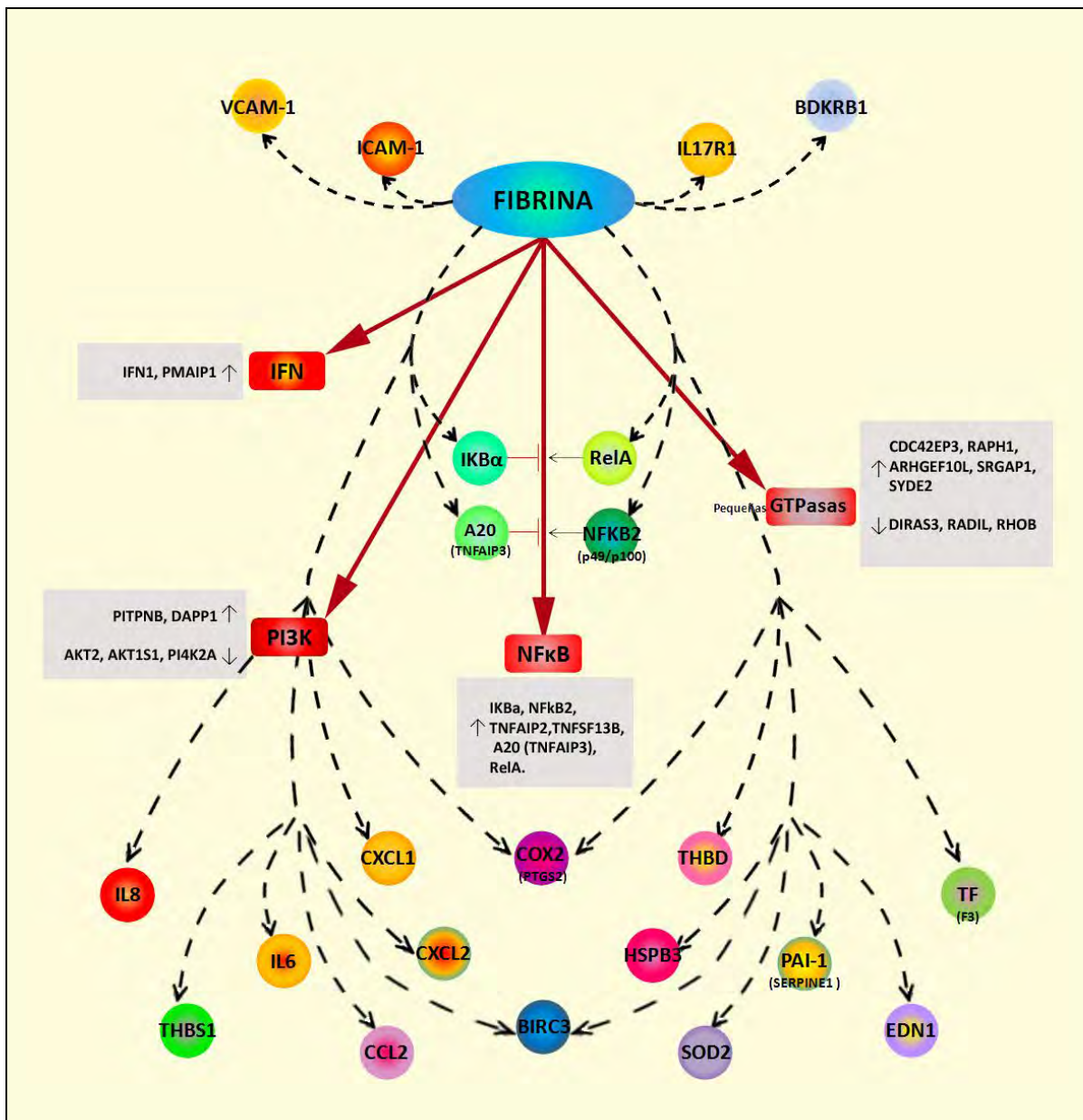
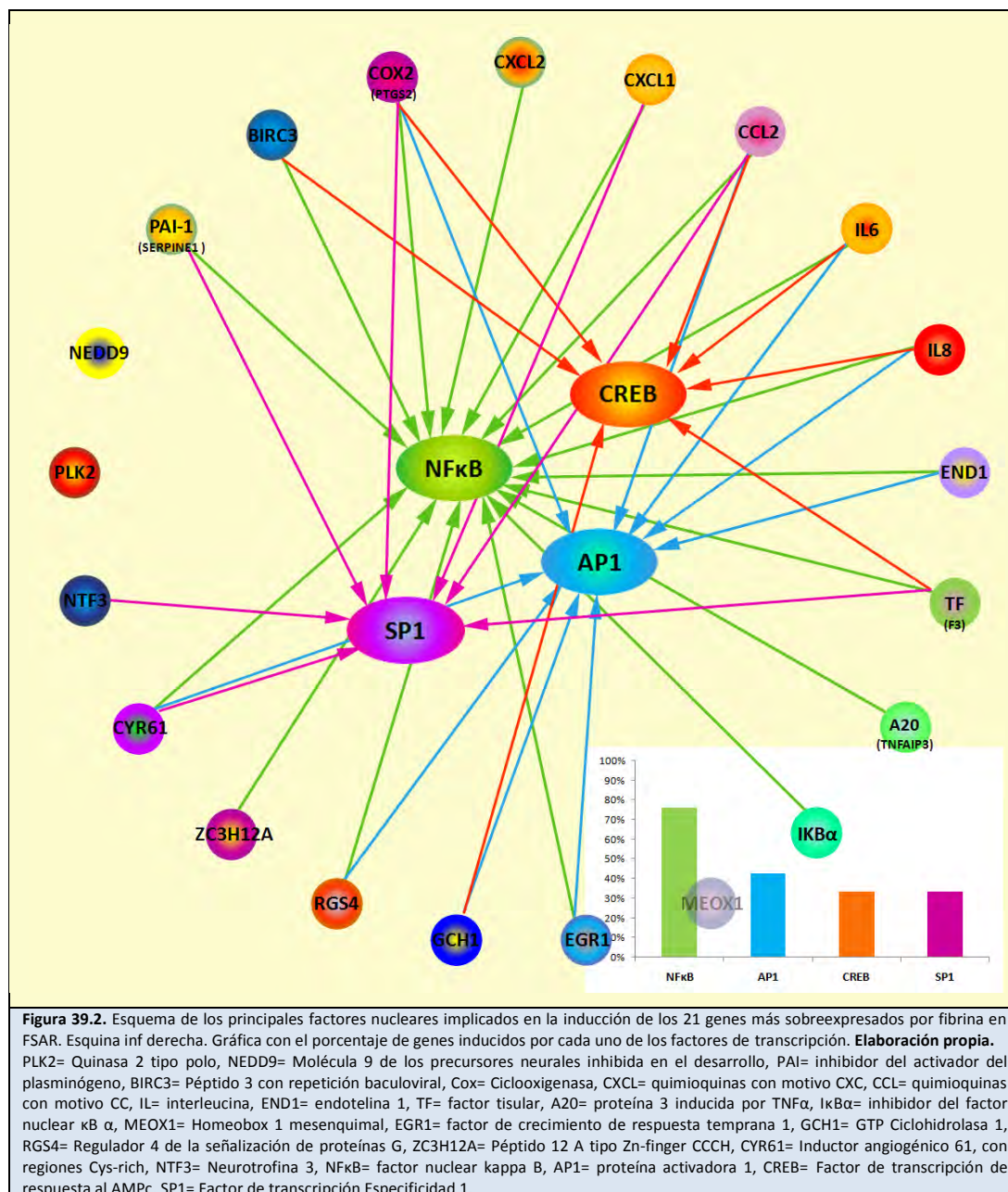


Figura 39.1. Esquema de activación inducida por fibrina en FSAR. **Elaboración propia.**

VCAM= molécula de adhesión celular vascular, ICAM= molécula de adhesión intercelular, IL17R1= receptor 1 de la interleucina 17, BDKRB1= receptor B1 de la bradiquinina, IFN= interferón, PMAIP1= proteína 1 inducida por forbol 12 miristato 13 acetato, IκBα= inhibidor del factor nuclear κBα, RelA= factor de transcripción p65, A20= proteína 3 inducida por TNFα, PI3K= Fosfoinositol 3 quinasa, PITPNB= proteína fosfatidilinositol transferasa beta, DAPP1= adaptador dual de fosfotirosina y 3 fosfoinosítidos, AKT= proteína quinasa B alfa, AKT1S1= sustrato 1 de AKT1, PI4K2A= fosfatidilinositol 4-quinasa Tipo 2 Alfa, IL= interleucina, THBS1= trombospodina1, CXCL= quimioquinas con motivo CXC, CCL= quimioquinas con motivo CC, COX= Ciclooxigenasa, BIRC3=Péptido 3 con repetición baculoviral, THBD= trombosmodulina, HSPB3= proteína de choque térmico, SOD= superóxido dismutasa, PAI= inhibidor del activador del plasminógeno, EDN1= endotelina 1, TF= factor tisular, TNFAIP= proteína inducida por TNFα, CDC42EP= Proteína efectora (de unión a GTPasa Rho) CDC42, RAPH=Péptido asociado a Ras con dominios homólogos a plecstrina, ARHGEF= Factor de intercambio nucleotídico guanina rho, SRGAP1= Proteína activadora de GTPasa Rho SLIT-ROBO 1, SYDE2= Homólogo 2 de GTPasas Rho, defectivo en sinapsis 1, DIRAS3= Péptido similar a RAS 3, RADIL= Péptido asociado a Ras con dominios DIL, RHOB= Homólogo B de la familia Ras.



Tras el análisis del transcriptoma inducido por fibrina, observamos muchas moléculas con clara actividad proinflamatoria en los FSAR. Entre ellas, las citoquinas IL8 e IL6, fueron las utilizadas para estudiarla respuesta celular a la fibrina; sin embargo, además de éstas, seleccionamos algunas más para confirmar su inducción con técnicas cuantitativas.

En particular, ICAM-1 posee un importante papel en el reclutamiento de células del infiltrado de la membrana sinovial AR (Lee DM y Weinblatt ME, 2001 [w/](#)) (Sweeney SE y Firestein GS, 2004 [w/](#)) y su activación por fibrinógeno había sido descrita previamente en FSAR (Liu X y Piela-Smith TH, 2000 [w/](#)). También pudimos confirmar la inducción de IP10 (CXCL10), cuyo papel es importante en el reclutamiento células T

y macrófagos y en la resorción ósea (Kwak HB, et al., 2008 [w/](#)). Sin embargo, en contraste con lo publicado en otros estudios (Hanaoka R, et al., 2003 [w/](#)) su activación no fue dependiente de ICAM-1.

Uno de los efectos de la fibrina a subrayar fue el producido sobre las ciclooxygenasas, ya que no sólo provocó un incremento de la expresión de Cox2 , sino que produjo una marcada disminución de la isoforma constitutiva, Cox1 (Smith WL, 1989 [w/](#)) (Mohale DS, et al., 2014 [w/](#)). La Cox2 es uno de los principales genes dependientes de NFκB. Se trata de una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas y de citoquinas responsables de la hipersensibilidad nocifectora. Se considera de gran relevancia en la respuesta inflamatoria temprana y también en procesos de inflamación crónica (Flower RJ, 2003 [w/](#)) (Vanegas H y Schaible HG, 2001 [w/](#)) (Crofford LJ, 1997 [w/](#)) (Mohale DS, et al., 2014 [w/](#)). La Cox1 tiene un papel fundamental en las acciones homeostáticas de los derivados del ácido araquidónico, incluyendo la resolución de la inflamación (Bassal NK, et al., 2012 [w/](#)) (Scher JU y Pillinger MH, 2009 [w/](#)) y su disminución podría considerarse como un factor perpetuador en la AR.

2. Identificación del receptor de la fibrina en los fibroblastos sinoviales reumatoides

El factor de transcripción NFκB es uno de los principales responsables de la activación de la inmunidad innata, en respuesta al reconocimiento de PAMPs a través de RRP. Se sabe que este tipo de receptores también puede activarse en respuesta a señales de alarma endógenas (DAMPs), como marcadores de daño tisular o trauma (Bianchi ME, 2007 [w/](#)). Además, los ligandos endógenos podrían tener una mayor capacidad de mantenerse expresados, constituyendo, por tanto, un aporte de combustible para perpetuar la inflamación. Esta interacción persistente podría facilitar la presentación a las células T de péptidos de la molécula autóloga, a través de las MHC, iniciando la respuesta adaptativa, y activando así la fase autoinmune de la enfermedad, evidenciando así la participación de algunos efectores de la inmunidad innata en la generación o potenciación fisiopatológica de las enfermedades autoinmunes (Pawar RD, et al., 2007 [w/](#)) (Fang J, et al., 2010 [w/](#)) (Úsuga X y Ossa AC, 2012 [w/](#)).

Los TLRs son una familia de receptores presentes en las membranas celulares, conservada evolutivamente y una de las familias más importantes de RRP. Se han descrito 10 TLR humanos. Como se muestra en la tabla 3 se conoce una gran cantidad de ligandos exógenos de los diferentes TLR y también un número creciente de ligandos endógenos. Entre éstos, el fibrinógeno puede ser reconocido por los

receptores TLR4 (Smiley ST, et al., 2001 [w/](#)) (Hodgkinson CP, et al., 2008 [w/](#)). Este hecho, nos llevó a investigar si TLR4 podía ser el receptor principal de la fibrina en la inducción génica que habíamos observado en los FSAR.

Toll	Ligando exógeno	Ligando endógeno
TLR1	Triacil-lipopéptidos _{1,2}	
TLR2	Lipopéptidos ₁ -Diacil-lipopéptidos ₂ -Triacil-lipopéptidos ₂ Lipo-proteínas y peptidoglicanos _{3, 2} Lipoglicanos ₂ Ácidos lipoteicoicos ₂ Cimosano ₂ Porinas ₂ Lipoarabinomanano ₂ Fosfolipomanano ₂ Glucuronoxilomanano ₂ Inhibidor de proteasa <i>Toxoplasma gondii</i> 1 (<i>Toxoplasma gondii</i> protease inhibitor-1) tGPI-mutin ₂ Hemaglutinina ₂	Hsp60 _{4,5} Hsp70 _{6, 7} gp96 (endoplasmína) ₈ HMGB1 _{9,10} Biglicanos ₁₁ Miosina cardíaca humana ₁₂ Ácido hialurónico _{13,14,15} Cristales de urato monosódico _{16,17} Proteína sérica amiloide A ₁₈
TLR3	ARN de doble cadena (dsRNA) _{19,2}	ARNm _{20,21}
TLR4	LPS _{22,2} Manano ₂ -Glucuronoxilomanano ₂ proteínas de envuelta ₂ Glicoinositolfosfolípidos ₂	Hsp60 _{23,4,5,24} Hsp72 _{25,26} Fibrinógeno _{27,28} Proteína surfactante-A ₂₉ Fibronectina (dominioA) ₃₀ Heparán sulfato (CD138) _{31,32} Ácido hialurónico _{13, 33,15,34} β-defensina 2 _{35,36} Hsp70 _{6,37,7} gp96 ₈ HMGB1 ₉ Biglicano ₁₁ Cristales de urato monosódico _{16,17} OxPAPC ₃₈ Resistina ₃₉ Proteínas S100 (Mrp8/14) _{40,41} tenascina-C ₄₂ HSP22 (α-cristalina cadena A) ₄₃
TLR5	Flagelina _{44,2}	
TLR6	Diacil-lipopéptidos _{45,2} Ácidos lipoteicoicos ₂ Cimosano ₂	
TLR7	ARN de cadena simple (ssRNA) _{46, 2,47} Compuestos sintéticos similares a ácidos nucleicos como imidazoquinolinas ₄₈	ARN _{49,50} ARN pequeño de interferencia (siRNA) ₅₁
TLR8	Imidazoquinoline resiquimod (R-848) ₅₂ ssRNA _{2,47}	Miosina cardíaca humana ₁₂ ARN pequeño de interferencia (siRNA) ₅₁
TLR9	Secuencias de AND CpG no metiladas _{53,2} Hemozoina ₂	DNA _{54, 55} HMGB1 ₅₆
TLR10	ND ₅₇	

Tabla 3. Lista de los receptores TLR con sus correspondientes ligandos exógenos y endógenos. ND= No determinado

Referencias: 1 - Takeuchi O, et al., 2002 [w/](#); 2 - Akira S, et al., 2006 [w/](#); 3 - Takeuchi O, et al., 1999 [w/](#); 4 - Bulut Y, et al., 2002 [w/](#); 5 - Vabulas RM, et al., 2001 [w/](#); 6 - Asea A, et al., 2002 [w/](#); 7 - Vabulas RM, et al., 2002a [w/](#); 8 - Vabulas RM, et al., 2002 [w/](#); 9 - Park JS, et al., 2004 [w/](#); 10 - Curtin JF, et al., 2009 [w/](#); 11 - Schaefer L, et al., 2005 [w/](#); 12 - Zhang P, et al., 2009 [w/](#); 13 - Jiang D, et al., 2005 [w/](#); 14 - Scheibner KA, et al., 2006 [w/](#); 15 - Tesar BM, et al., 2006 [w/](#); 16 - Liu-Bryan R, et al., 2005 [w/](#); 17 - Liu-Bryan R, et al., 2005 [w/](#); 18 - Cheng N, et al., 2008 [w/](#); 19 - Alexopoulou L, et al., 2001 [w/](#); 20 - Kariko K, et al., 2004 [w/](#); 21 - Cavassani KA, et al., 2008 [w/](#); 22 - Poltorak A, et al., 1998 [w/](#); 23 - Ohashi K, et al., 2000 [w/](#); 24 - Lehnardt S, et al., 2008 [w/](#); 25 - Chase MA, et al., 2007 [w/](#); 26 - Wheeler DS, et al., 2009 [w/](#); 27 - Smiley ST, et al., 2001 [w/](#); 28 - Hodgkinson CP, et al., 2008 [w/](#); 29 - Guillot L, et al., 2002 [w/](#); 30 - Okamura Y, et al., 2001 [w/](#); 31 - Johnson GB, et al., 2002 [w/](#); 32 - Johnson GB, et al., 2004 [w/](#); 33 - Termeer C, et al., 2002 [w/](#); 34 - Iwata Y, et al., 2009 [w/](#); 35 - Biragyn A, et al., 2002 [w/](#); 36 - Biragyn A, et al., 2008 [w/](#); 37 - Dybdahl B, et al., 2002 [w/](#); 38 - Imai Y, et al., 2008 [w/](#); 39 - Tarkowski A, et al., 2009 [w/](#); 40 - Vogl T, et al., 2007 [w/](#); 41 - Croce K, et al., 2009 [w/](#); 42 - Midwood K, et al., 2009 [w/](#); 43 - Roelofs MF, et al., 2006 [w/](#); 44 - Hayashi F, et al., 2001 [w/](#); 45 - Takeuchi O, et al., 2001 [w/](#); 46 - Lund JM, et al., 2004 [w/](#); 47 - Sarvestani ST, et al., 2013 [w/](#); 48 - Hemmi H, et al., 2002 [w/](#); 49 - Lau CM, et al., 2005 [w/](#); 50 - Kelly KM, et al., 2006 [w/](#); 51 - Sioud M, 2006 [w/](#); 52 - Jurk M, et al., 2002 [w/](#); 53 - Hemmi H, et al., 2000 [w/](#); 54 - Leadbetter EA, et al., 2002 [w/](#); 55 - Viglianti GA, et al., 2003 [w/](#); 56 - Tian J, et al., 2007 [w/](#); 57 - Oosting M, et al., 2014 [w/](#).

En nuestro estudio, pudimos demostrar que el bloqueo de TLR4 inhibe la activación de NFκB y la inducción de las citoquinas proinflamatorias IL8 e IL6 en los FSAR. Aunque nuestros estudios se han enfocado únicamente en FS, concuerdan con los resultados observados en estudios previos (Smiley ST, et al., 2001 [w/](#)) (Hodgkinson CP, et al., 2008 [w/](#)), realizados en macrófagos sinoviales, donde se demostró que la

fibrina actúa como un ligando endógeno de TLR4 y es capaz de activar la síntesis de IL6 y TNF α e incrementar la actividad del promotor de IL8, MMP1, MMP9, y MCP-1, lo que hace intuir la existencia de una cascada de señalización y activación similar entre ambas poblaciones celulares con implicaciones de igual relevancia en la patogenia de la enfermedad.

La señalización a través de TLR, como se puede apreciar en la figura 40, tiene lugar, característicamente, de forma coordinada. Habitualmente, parece ser necesaria la activación de homo o heterodímeros de TLR o bien su asociación con otros tipos de moléculas como las integrinas que activan de manera diferencial los diferentes monómeros que componen la familia de los factores de NF κ B (Barrera V, et al., 2011 [w/](#)) (de Aguiar C, et al., 2014 [w/](#)) (Wang YC, et al., 2014 [w/](#)) (Motojima M, et al., 2009 [w/](#)) (Ozinsky A, et al., 2000 [w/](#)) (Chun KH y Seong SY, 2009 [w/](#)), así se ha descrito una íntima colaboración de TLR2 y TLR4 en la respuesta frente a diferentes señales proinflamatorias como LPS (Good DW, et al., 2012 [w/](#)) (Motojima M, et al., 2009 [w/](#)) (Chun KH y Seong SY, 2009 [w/](#)). Por otro lado, diversos estudios atribuyen a los receptores TLR2 un papel en la patogenia de la AR y de modelos experimentales de la enfermedad (Joosten LA, et al., 2003 [w/](#)) (Abdollahi-Roodsaz S, et al., 2008 [w/](#)), que no solo presentan patrones de respuesta similar a TLR4 (Xu L, et al., 2013 [w/](#)) (Perveen K, et al., 2014 [w/](#)), sino que poseen sinergia positiva e incluso tolerancia cruzada entre ambos receptores frente a diferentes estímulos, fibrinógeno incluido (Lee KS, et al., 2007 [w/](#)) (Motojima M, et al., 2009 [w/](#)) (Sato S, et al., 2000 [w/](#)).

Igualmente, se ha demostrado la participación de ICAM-1 tras su unión a fibrinógeno en el aumento de la supervivencia y proliferación de células endoteliales y linfocitos B (Gardiner EE y D'Souza SE, 1999 [w/](#)) (Pluskota E y D'Souza SE, 2000 [w/](#)). Finalmente, se han observado los efectos beneficiosos de la delección o uso de anticuerpos bloqueantes frente a TLR2, TLR4 e ICAM-1 en pacientes o modelos animales de AR (Schulze-Koops H, et al., 1996 [w/](#)) (Kavanaugh AF, et al., 1996 [w/](#)) (Pierer M, et al., 2011 [w/](#)) (Abdollahi-Roodsaz S, et al., 2008 [w/](#)) (Joosten LA, et al., 2003 [w/](#)), teniendo en cuenta descripciones previas, decidimos estudiar la participación de los receptores TLR2 e ICAM-1 en las acciones pro-inflamatorias de la fibrina sobre los FSAR.

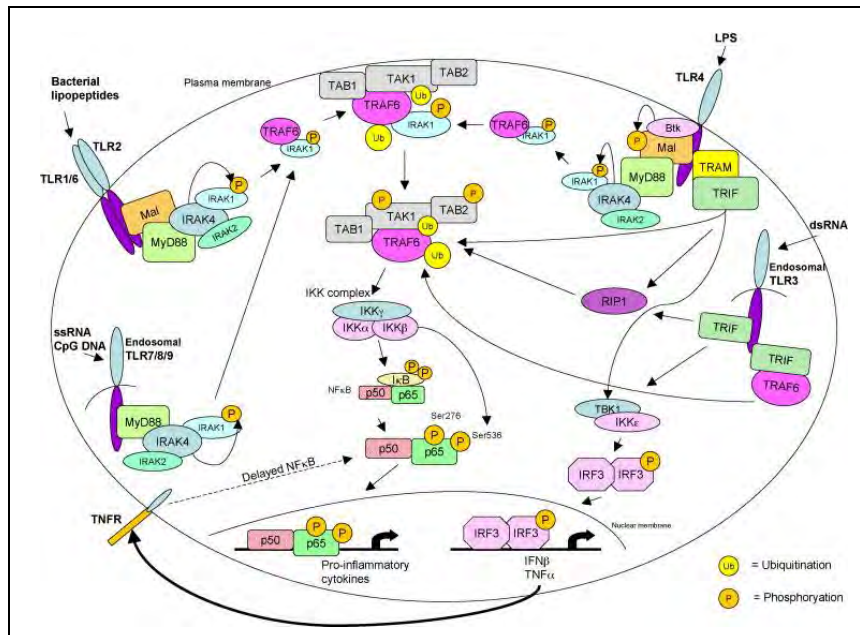


Figura 40. Esquema general de la ruta de activación de NFκB e IRF3 vía TLR. En presencia de ligandos, TLR4 se dimeriza y TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6, estos dímeros reclutan a través de sus dominios TIR el adaptador Mal en conjunto con MyD88, TLR7/8/9 reclutan MyD88 directamente. Una vez activado, MyD88 se une a IRAK4, el cual fosforila a IRAK1, activándolo e induciendo su unión a través de TRAF6 al complejo de membrana TAB1/TAK1/TAB2 donde TRAF6 y TAK1 se activan mediante ubiquitinización y desligan el complejo de la membrana, una vez desligado, TAK1 es capaz de fosforilar el complejo IKK, que a su vez fosforila IκB induciendo su degradación, al igual que fosforila a p65 a través de IKKβ. Btk interactúa con el dominio TIR de TLR4 y fosforila Mal, activando la ruta anterior. Una vez degradado IκB, NFκB es libre y se puede translocar al núcleo, donde se une a sus promotores e inicia la expresión de citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, tanto TLR3 de forma directa, como TLR4 a través de TRAM, reclutan TRIF, este se une a TRAF6 directamente dando lugar a una activación de TAK1 independiente de IRAK1/4. Por otro lado, TRIF también se une a RIP1 que de nuevo active a TRAF6. Finalmente, TRIF es capaz también de unirse a TBK1/IKKε, activando la fosforilación y translocación al núcleo de IRF3 y expresión de sus genes diana, dentro de los que se encuentra TNF, que se libera y une a su receptor, dando lugar a una respuesta tardía de NFκB.

Fuente: Doyle, SL. Y O'Neill LA, 2006 [w/](#).

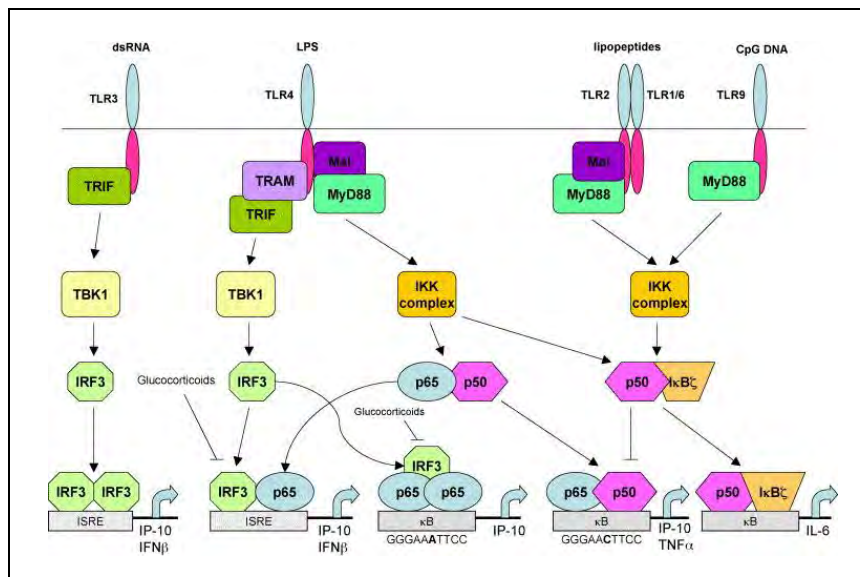


Figura 41. Especificidad de las subunidades de NFκB. TLR3 recluta TRIF a su dominio TIR activando IRF3 que se une como dímero a los Elementos de Respuesta a Interferón (ISRE) de los genes IFNβ e IP-10. TLR4 recluta TRAM a través de su dominio TIR que a su vez recluta a TRIF y activa TBK1, por otro lado también recluta a MyD88 a través de Mal, activando el complejo IKK. TBK1 activa IRF3 e IKK los dímeros p65/p50 de NFκB. Posteriormente p65 e IRF3 dimerizan uniéndose a los elementos ISRE (que puede ser inhibidos por glucocorticoides). Por otro lado el complejo p65/p50 se une al sitio κB – 5'-GGGAATTCC-3' – en respuesta a LPS e induce la expresión de IP-10 y genes proinflamatorios. De igual modo se pueden formar homodímeros de p65 que se unen a las regiones κB con un nucleótido de diferencia 5'-GGGAATTCC-3' e inducen IP-10 únicamente cuando poseen un IRF3 como coactivador. Por otro lado la activación por parte de TLR2/4/9 de IKK induce la interacción de p50/IκBα que se une a las regiones κB induciendo genes proinflamatorios como IL-6 e inhiben la producción de TNFα.

Fuente: Doyle, SL. Y O'Neill LA, 2006 [w/](#).

Tras los estudios de silenciamiento de ICAM-1 y TLR2, en contraste con los resultados obtenidos por otros grupos (Yasuda T, 2007 *et al*) no fuimos capaces de observar cambios en la expresión de IL6 e IL8 tras el silenciamiento de ICAM-1, de igual modo tampoco pudimos confirmar la participación de TLR2, lo que sugiere que estos receptores no tienen un papel relevante en la señalización de la fibrina asociado a estas células. Lo que nos lleva a proponer una ruta como la que se muestra en la figura 42, donde TLR4 activa mediante la vía canónica y/o no canónica la quinasa 1 activada por factor de crecimiento transformante beta (TAK1) que termina activando el factor de transcripción NFκB y de forma secundaria AP1 y CREB, desencadenando así la activación de numerosos genes que contribuyen a la transformación fenotípica de los RASF.

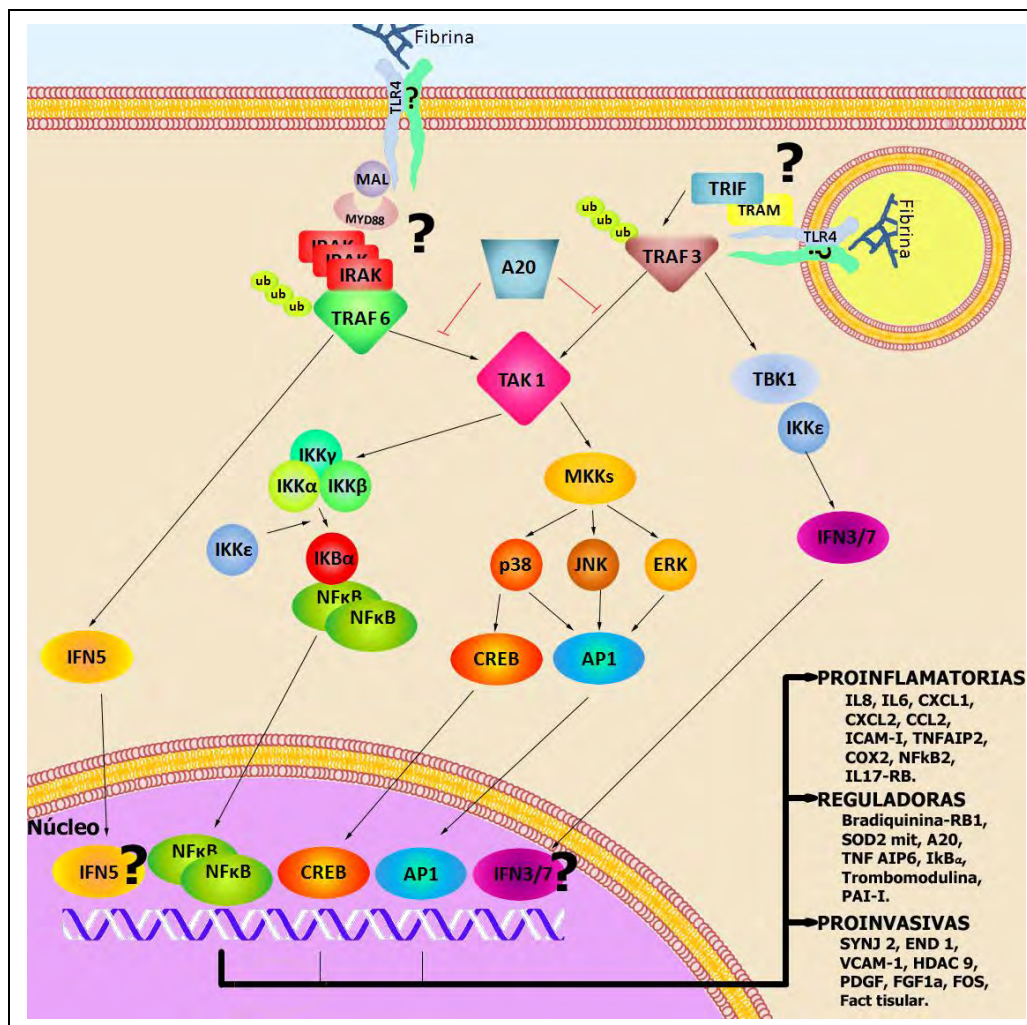


Figura 42. Propuesta de ruta de activación mediada por fibrina en RASF. La fibrina es reconocida por el receptor TLR4, la unión de la fibrina provoca la dimerización del receptor mediante homo o heterodímeros de naturaleza aún por determinar, estos dímeros pueden reclutar a través de sus dominios TIR el adaptador Mal en conjunto con MyD88 y/o el adaptador TRIF. La activación por ambas vías conduce a la activación de TAK1. Una vez activado TAK1 por un lado es capaz de fosforilar el complejo IKK induciendo su degradación y dejando libre a NFκB, y por otro lado, es también capaz de activar las quinasas JNK, ERK y p38, activando los factores de transcripción CREB y AP1, una vez activados los factores de transcripción NFκB, CREB y AP1 son capaces de translocarse al núcleo activando la transcripción de sus genes diana. **Elaboración propia.**

MAL= Proteína Mal de diferenciación de células T, IRAK= Quinasa asociada al receptor de IL1, TRAF= Factor asociado al receptor del TNF, TRIF= Dominio TIR con adaptador inductor de IFNβ, TRAM= Proteína de translocación asociada a membrana, TBK= Quinasa de TANK, IKK= Quinasa inhibidora del factor nuclear κB, MKK= MAP quinasa quinasa, JNK= quinasas c-Jun N-terminal, ERK= Quinasas reguladas por señales extracelulares, UB= ubiquitina.

3. La citrulinación de fibrina en el efecto inducido en células sinoviales reumatoides

Con el reciente descubrimiento de la citrulinación peptídica como elemento básico en la pérdida de la autotolerancia en la AR, surgía la posibilidad de que esta modificación postraducciona de la fibrina pudiera actuar también como amplificadora de la activación celular en la sinovitis. Nuestros resultados, apuntan efectivamente hacia este posible papel la fibrina citrulinada en la inducción de IL6 e IL8 en los FSAR. Tanto las enzimas PAD2 y PAD4 como los niveles de proteínas citrulinadas, están aumentados en líquido y tejido sinovial de los pacientes con AR (si bien no son exclusivas de éstos) y su concentración se ha puesto en relación con la gravedad de la enfermedad (Foulquier C, et al., 2007 [w/](#)) (Chapuy-Regaud S, et al., 2005 [w/](#)) (Kinloch A, et al., 2008 [w/](#)) (Turunen S, et al., 2013 [w/](#)), lo que indica el papel de la citrulinación peptídica en la enfermedad.

Estudios previos han asociado a ambas isoenzimas con la citrulinación intraarticular de la fibrina (Foulquier C, et al., 2007 [w/](#)). En nuestras condiciones experimentales, la actividad de PAD4 fue mucho menos eficiente que la de PAD2 en la modificación de la fibrina y esto se acompañó de una acción menos concluyente en la expresión de IL6 e IL8 tras estimulación con fibrina citrulinada con PAD4. Otros estudios habían arrojado resultados similares, lo que sugiere una diferente especificidad de cada una de las enzimas hacia diferentes sustratos (Darrah E, et al., 2011 [w/](#)), así como una mayor resistencia de la fibrina a la acción de la PAD4 (van Beers JJ, et al., 2010 [w/](#)). También es interesante subrayar que la isoforma PAD2 ha sido aislada en líquido sinovial procedente de pacientes con AR, pero no en pacientes con OA (Kinloch A, et al., 2008 [w/](#)), lo que confiere a PAD2 una cierta selectividad por la citrulinación de macromoléculas asociada a procesos inflamatorios.

Los mecanismos por los que la fibrina citrulinada podría presentar una mayor actividad celular proinflamatoria no se conocen y no se han abordado en nuestro estudio, sin embargo, se han descrito secuencias susceptibles de citrulinación y secuencias peptídicas altamente inmunorreactivas frente a ACPAs, que aparecen justo antes o dentro de secuencias de criba de la plasmina. Esto sugiere, que la citrulinación es capaz de interferir en la degradación de la fibrina mediante alteraciones en las secuencias de criba y mediante el bloqueo de estas secuencias por parte de los ACPAs (Sebbag M, et al., 2006 [w/](#)) (Bhattacharjee P y Bhattacharyya D, 2014 [w/](#)). Por otra parte, la citrulinación produce alteraciones en la estructura terciaria que pueden

determinar cambios en la afinidad de los receptores o destapar sitios de unión que en estado nativo permaneciesen ocultos (Chang X, et al., 2005b [w/](#)).

4. Asociación entre los depósitos de fibrina e invasividad en fibroblastos sinoviales y en la membrana sinovial reumatoide

La segunda parte de nuestra hipótesis en este estudio fue que el contacto con la fibrina podría promover el daño tisular al promover mecanismos proinvasivos en los FSAR. Mediante estudios de inmunolocalización, confirmamos según lo previamente descrito (Weinberg JB, et al., 1991 [w/](#)) (Clemmensen I, et al., 1983 [w/](#)) (Andersen RB y Gormsen J, 1970 [w/](#)), la presencia de fibrina en los frentes de invasión de la membrana sinovial, así como una relación directa entre la abundancia de los depósitos y la gravedad de la sinovitis.

Si bien encontramos algunas moléculas proinvasivas en el transcriptoma inducido por fibrina en FSAR, nuestros estudios de PCR cuantitativa, realizados en nuevos cultivos celulares no lograron reproducir la estimulación de las moléculas seleccionadas. La posibilidad de que la fibrina actúe sobre estos mediadores queda, por tanto, pendiente de la realización de nuevos estudios. Sin embargo, la molécula de adhesión VCAM-1 merece un breve comentario. Este receptor interviene en la infiltración de la membrana sinovial por diferentes células inflamatorias como eosinófilos, basófilos, linfocitos, mastocitos y monocitos (Bradfield PF, et al., 2003 [w/](#)) (Cook-Mills JM, et al., 2010 [w/](#)) y está asociada a invasividad de células tumorales (Xia Q, et al., 2015 [w/](#)) (Okada T, et al., 1999 [w/](#)) (Ding YB, et al., 2003 [w/](#)). Las células sinoviales no estimuladas no deberían tener niveles detectables de VCAM-1. En nuestro estudio, un 50% de FSAR presentaron expresión de VCAM-1 en condiciones basales, datos que concuerdan con descripciones previas, en las que incluso se señala la presencia constitutiva de VCAM-1 en FSAR (Klimiuk PA, et al., 2002 [w/](#)) (Li P, et al., 2000 [w/](#)) (Bartok B y Firestein GS, 2010 [w/](#)). Estos hallazgos sugieren que VCAM-1 es un marcador de la transformación invasiva de los FSAR. En nuestros cultivos de FSAR con expresión constitutiva de VCAM-1, la adición de fibrina no produjo cambios en los niveles de ARNm. Por el contrario, la fibrina fue capaz de inducir la expresión de VCAM-1 en aquellos cultivos en los que no existía expresión basal, lo que podría apoyar un papel de la fibrina en la adquisición de invasividad por parte de los FSAR (Carter RA, et al., 2002 [w/](#)) (Li P, et al., 2000 [w/](#)) (Ahmed S, et al., 2013 [w/](#)) (Firestein GS, 1996 [w/](#)) (Navarro-Hernandez RE, et al., 2009 [w/](#)).

Otra característica del fenotipo invasivo de los FSAR es la elevada producción de metaloproteinasas, encargadas de eliminar los componentes de la matriz extracelular (Miller MC, et al., 2009 [w/](#)) (Vassiliadis E, et al., 2012 [w/](#)) (Prystupa A, et al., 2015 [w/](#)) (Nastase A, et al., 2011 [w/](#)). Las MMPs participan en la digestión no constitutiva de la fibrina durante la inflamación (Bini A, et al., 1996 [w/](#)) (Hotary KB, et al., 2002 [w/](#)). Se ha descrito que las mallas de fibrina son especialmente insolubles en las articulaciones de los pacientes (Pretorius E, et al., 2011 [w/](#)) (Kwasny-Krochin B, et al., 2010 [w/](#)). Además, como hemos mencionado, la citrulinación dificulta su degradación por la plasmina (Sebbag M, et al., 2006 [w/](#)) (Bhattacharjee P y Bhattacharyya D, 2014 [w/](#)). Estudios realizados con técnicas de *microarray* en macrófagos y microglía murinos encontraron una sobreexpresión de las MMP9 y 14 tras estimulación con fibrina y fibrinógeno (Ryu JK, et al., 2015 [w/](#)). Por todo ello, decidimos explorar la expresión de las MMP en respuesta a fibrina en los FSAR a pesar de no haber objetivado su inducción en nuestro transcriptoma. En los estudios en tejido se colocaron MMP1 y 3 en las áreas ricas en fibrina, en particular en las zonas próximas al frente erosivo. Esta estimulación fue igualmente observada en cultivos celulares aunque, a diferencia de lo descrito en otras estirpes celulares, no fuimos capaces de observar efectos sobre las MMP14 y 9 en FSAR.

5. Especificidad patológica del efecto de la fibrina en los fibroblastos sinoviales

Los FSAR se caracterizan por tener un fenotipo diferente al de los FS sanos, que ha sido atribuido a su alteración crónica derivada del microambiente sinovial, perpetuada por mecanismos epigenéticos. En este sentido, el perfil de expresión génica de estas células, se transmite a lo largo de varios pases en cultivo (Muller-Ladner U, et al., 1996 [w/](#)) (Bartok B y Firestein GS, 2010 [w/](#)) (Bottini N y Firestein GS, 2013 [w/](#)). Estas alteraciones fenotípicas podrían determinar que los FSAR mostraran una respuesta diferente a la fibrina que otros FS. Sin embargo, con los estudios realizados no podemos apoyar que el efecto de la fibrina fuera específico de los FSAR, dado que la mayoría de las acciones fueron similares en los FSOA. Una de las principales diferencias que observamos entre ambas poblaciones de células fue la sobreexpresión de TLR4 exhibida por los FSAR. Este hallazgo había sido observado previamente (Radstake TR, et al., 2004 [w/](#)) (Xu D, et al., 2015 [w/](#)) y podría tener gran relevancia dado el papel central que ejerce este receptor en las acciones de la fibrina

en los fibroblastos sinoviales. Nuestros datos sugieren que la expresión de este receptor puede constituir un marcador del fenotipo invasivo de los FSAR.

6. Diferentes dianas terapéuticas enfocadas especialmente en los primeros eventos patológicos de la enfermedad

Cuando iniciamos este estudio, teníamos dos objetivos fundamentales. El primero de ellos, era tratar de establecer la interacción entre la fibrina y las células sinoviales como uno de los procesos generadores de la AR; es decir, capaz de poner en marcha la producción de mediadores patogénicos de la enfermedad, sin la intervención de otros factores, incluyendo el sistema inmune específico. Una vez expuestos los argumentos que apoyan este papel de la fibrina, nuestro segundo objetivo es identificar dianas terapéuticas basadas en este nuevo proceso patogénico, no utilizadas hasta el momento. Como muestra la figura 43, la mayoría de los tratamientos actuales podrían estar actuando corriente abajo en la cascada de señalización dependiente de la fibrina o tras la creación de memoria inmunológica. Igualmente, es de subrayar que ninguna de las dianas propuestas muestra una alta especificidad en la enfermedad, a tenor de los resultados obtenidos en la comparación de FSOA y FSAR.

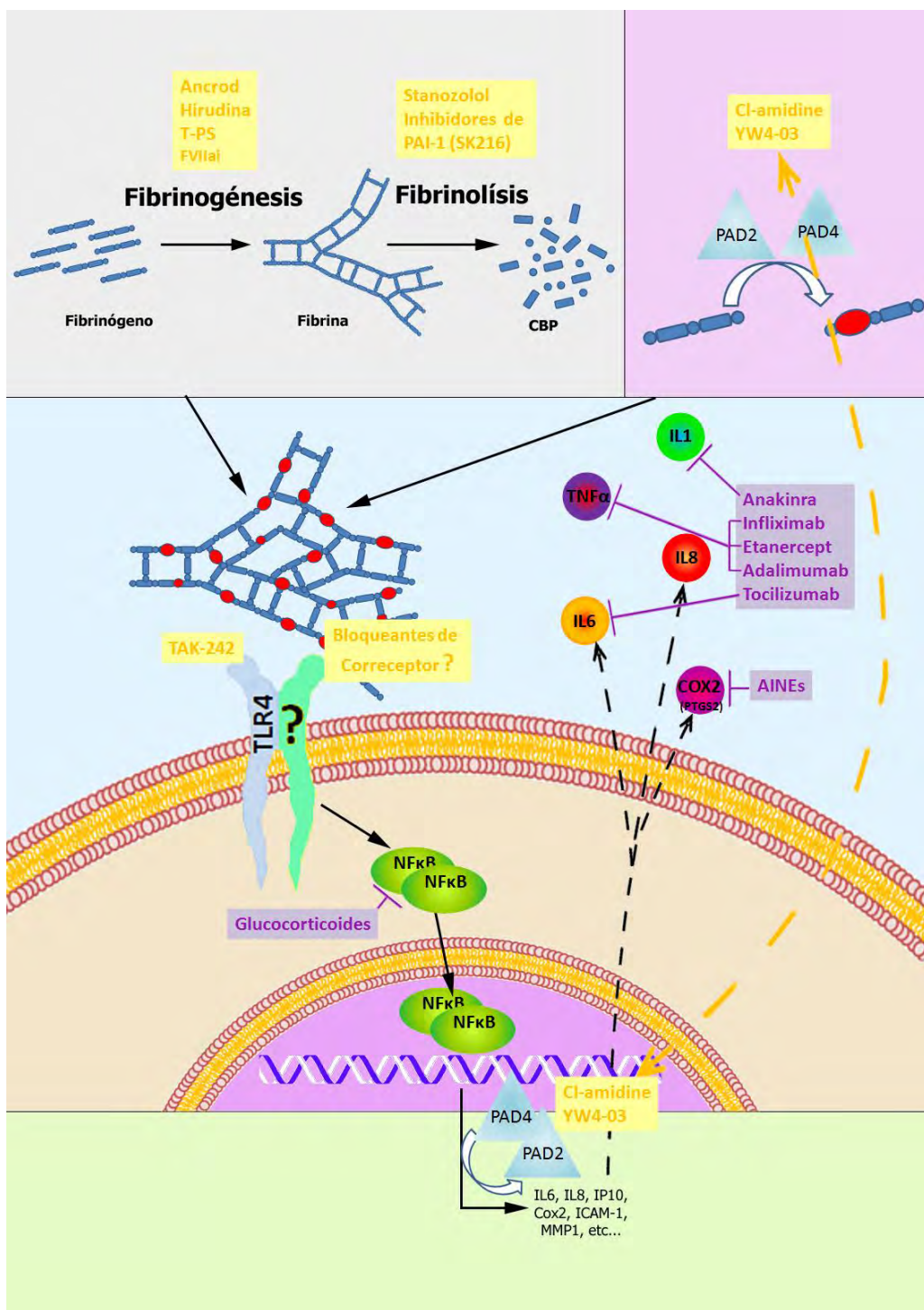


Figura 43. Esquema de mecanismos de acción en respuesta a la fibrina en RASF, junto con dianas terapéuticas propuestas (amarillo) y convencionales (morado). En la esquina superior izquierda aparecen las vías de fibrinogénesis y fibrinolisis, junto a fármacos propuestos para la modulación de ambas vías: **Inhibidores de fibrinogénesis:** Ancrod, reduce los niveles de fibrinógeno plasmático, el bloqueante de trombina Hirudina, el fármaco T-PS (Profármaco fotosensibilizante polimérico sensible a la trombina), un fármaco citotóxico dirigido hacia células productoras de trombina, y el bloqueador del sitio activo del factor VII (FVIIai). **Activadores de fibrinolisis:** Stanozolol, activador de plasminógeno, SK-216 inhibidor de PAI-1. En la esquina superior derecha aparece el mecanismo de **citrulinación** de las peptidil arginín deiminasas (PAD) 2 y 4 que citrulinan entre otros sustratos el fibrinógeno y las matrices de fibrina y ayudarían al procesamiento de diferentes citoquinas proinflamatorias a nivel posttranscripcional (parte inferior de la imagen) y los inhibidores de estas enzimas propuestos, Cl-amidine inhibidor pan-PAD con mayor especificidad sobre PAD4 y YW4-03 con mayor especificidad sobre PAD2. En la parte central aparece la recepción de la fibrina por el receptor TLR4 y un posible coreceptor aún por determinar, y el **bloqueador de TLR4** TAK-242 así como agentes bloqueantes del posible coreceptor, por otro lado esta activación de TLR4 conlleva la activación de **NFκB**, que podría tratarse con glucocorticoides, una vez activado NFκB, este da lugar a la sobreexpresión de numerosos genes proinflamatorios como **IL6** y **Cox2** entre otros, por otro lado esta descrita la activación en la liberación de **IL1** y **TNFα** en macrófagos en respuesta a fibrina (Smiley, S. T., J. A. King, et al., 2001 [w/](#)), que podrían tratarse mediante el empleo de los fármacos tocilizumab, AINEs, anakinra y etanercept, infliximab y adalimumab respectivamente. **Elaboración propia.**

La interacción entre las mallas de fibrina y las células sinoviales es, sin duda, un proceso complejo capaz de aglutinar *in vivo* a un número muy amplio de moléculas. La tabla 4 resume las principales dianas que sugieren nuestros datos y los existentes en la literatura. Entre los bloqueantes de la fibrinogénesis, tratamientos con ancrod (que reduce los niveles de fibrinógeno) o con hirudina (inhibidor de la trombina), la administración de bloqueantes del TF, como el bloqueador del sitio activo del factor VIIa, así como el profármaco polimérico sensible a la trombina, han demostrado efectos beneficiosos en el desarrollo de las artritis experimentales (Busso N, et al., 1998 [w/](#)) (Marty I, et al., 2001 [w/](#)) (Varisco PA, et al., 2000 [w/](#)) (Busso N, et al., 2003 [w/](#)) (Gabriel D, et al., 2012 [w/](#)). También han demostrado efectividad los agentes que potencian la fibrinólisis, como el estanozolol, o la deficiencia de PAI-1 y sus inhibidores (Belch JJ, et al., 1986 [w/](#)) (Van Ness K, et al., 2002 [w/](#)) (Masuda T, et al., 2013 [w/](#)). Por otra parte, los datos mostrados por la supresión del plasminógeno o sus activadores u-PA y t-PA, son más controvertidos (Judex MO y Mueller BM, 2005 [w/](#)) (Li J, et al., 2005 [w/](#)) (Busso N, et al., 1998 [w/](#)) (Cook AD, et al., 2002 [w/](#)) (Yang YH, et al., 2001 [w/](#)). Su expresión parece atenuar la progresión de las lesiones en los estados iniciales de la artritis experimental, mientras que una vez establecida la enfermedad su papel es menos claro. Este hecho podría deberse a una mayor exposición de antígenos derivados de la fibrina tras su degradación, o a los mecanismos no relacionados con la fibrina como activación de PAR y MMPs (Busso N, et al., 1998 [w/](#)) (Judex MO y Mueller BM, 2005 [w/](#)) (Ward JR, et al., 2006 [w/](#)). En conclusión, las técnicas dirigidas a la inhibición de la coagulación parecen *a priori* más favorables que aquellas dirigidas a la ruta de degradación.

Acción en la homeostasis de fibrina	Fármaco o tratamiento (molécula diana)	Mecanismo de acción	Modelo/ensayo	Resultado	Referencia
Inhibidor de coagulación	Ancrod (fibrinógeno)	Reducción de niveles de fibrinógeno	Ratón transgénico u-PA (-/-) + AIA + Ancrod	Protección frente a la enfermedad	Busso N, et al., 1998 w/
Inhibidor de coagulación	Hirudina (trombina)	Inhibición no covalente de la trombina	Hirudina + CIA	Protección frente a la enfermedad	Marty I, et al., 2001 w/
Inhibidor de coagulación	Hirudina (trombina)	Inhibición no covalente de la trombina	Hirudina + AIA	Protección frente a la enfermedad	Varisco PA, et al., 2000 w/
Inhibidor de coagulación	FVIIa (factor VIIa)	Inhibición de Fact tisular	FVIIa + AIA	Protección frente a la enfermedad	Busso N, et al., 2003 w/
Inhibidor de coagulación*	T-PS (células productoras de trombina)	Fármaco citotóxico dirigido a células productoras de trombina	CIA + T-PS	Protección frente a enfermedad	Gabriel D, et al., 2012 w/
Fibrinolítico	Stanozolol	Activación de plasminógeno	Ensayo clínico	Mejora de los síntomas	Belch JJ, et al., 1986 w/
Fibrinolítico	Deleción génica (PAI-1)	Activación del plasminógeno	Ratón transgénico PAI-1 (-/-) + AIA	Protección frente a la enfermedad	Van Ness K, et al., 2002 w/
Inhibición de fibrinolisis	Deleción génica (u-PA/plg)	Inhibición del plasminógeno	Ratón transgénico u-PA (-/-) + CIA Plg (-/-) + CIA	Protección frente a la enfermedad	Li J, et al., 2005 w/
Inhibición de fibrinolisis	Deleción génica (u-PA/plg)	Inhibición de plasminógeno	Ratón transgénico u-PA (-/-) + AIA Plg (-/-) + AIA	Agravamiento de la enfermedad	Busso N, et al., 1998 w/
Inhibición de fibrinolisis	Deleción génica (u-PA/t-PA)	Inhibición de plasminógeno	Ratón transgénico u-PA (-/-) + CIA Ratón transgénico t-PA (-/-) + CIA	Protección de la enfermedad Agravamiento de la enfermedad	Cook AD, et al., 2002 w/
Inhibición de fibrinolisis	Deleción génica (t-PA)	Inhibición de plasminógeno	Ratón transgénico t-PA (-/-) + mBSA/IL-1-induced arthritis	Agravamiento de la enfermedad	Yang YH, et al., 2001 w/

Tabla 4. Listado de tratamientos implicados en la homeostasis de la fibrina, moléculas diana y mecanismos de acción en ensayos clínicos o modelos experimentales de AR.
T-PS= Profármaco fotosensibilizante polimérico sensible a la trombina, PAI-1= Inhibidor del activador de plasminógeno, u-PA = Activador del plasminógeno tipo uroquinasa, Plg= Plasminógeno, t-PA= Activador del plasminógeno tisular, AIA= Artritis inducida por antígeno, CIA = Artritis inducida por colágeno.
*TPS es una droga citotóxica dirigida a células que sintetizan trombina, no es exactamente un inhibidor de la coagulación.

Un segundo tipo de dianas expuestas en nuestro modelo lo constituyen las PADs. Actualmente hay en desarrollo numerosos inhibidores de esta familia de enzimas, tras ponerse de relieve su acción en el desarrollo tumoral y de otras numerosas enfermedades (Wang Y, et al., 2012 [w/](#)) (Cherrington BD, et al., 2012 [w/](#)) (Wood DD, et al., 2008 [w/](#)) (Acharya NK, et al., 2012 [w/](#)) (Ishigami A, et al., 2005 [w/](#)) (Knight JS, et al., 2013 [w/](#)). Estudios realizados en lupus, han sugerido que la inhibición de las PADs con Cl-amidina puede aportar, no sólo una mejoría clínica sino una reducción del riesgo de trombosis asociado a la enfermedad. Existen datos con respecto al mismo inhibidor en la AR experimental, que muestran el efecto de esta molécula sobre la producción de autoanticuerpos y la atenuación de la gravedad, si bien el tratamiento no fue capaz de prevenir la aparición de la artritis (Willis VC, et al., 2011 [w/](#)). En realidad, teniendo en cuenta nuestros resultados, el papel de la citrulinación parece ser potenciador, pero no imprescindible en las acciones de la fibrina (Jang B, et al., 2014 [w/](#)). Los estudios con inhibidores de PADs se encuentran en un estado incipiente de desarrollo, lo que no permite por el momento extraer conclusiones más definitivas.

Por otra parte, aunque Cl-amidina es un inhibidor pan-PAD, presenta una mayor especificidad ante PAD4. De acuerdo a nuestros resultados, parece existir una mayor implicación de PAD2 en la citrulinación de la fibrina y en la activación de los FSAR (van Beers JJ, et al., 2010 [w/](#)) (Kinloch A, et al., 2008 [w/](#)), lo que hace más

interesante estudiar el efecto de inhibidores específicos de PAD2, como YW4-03 (Sabulski MJ, et al., 2015 [w/](#)).

El siguiente escalón terapéutico es el bloqueo de TLR4, como principal mediador de las acciones de la fibrina en las células sinoviales, además de exhibir una sobreexpresión en las células de los pacientes con AR (Radstake TR, et al., 2004 [w/](#)) (Xu D, et al., 2015 [w/](#)). En ratones mutantes, la supresión de TLR4 confiere protección frente al desarrollo de CIA y de artritis espontánea en ratones IL1rn^{-/-} (Abdollahi-Roodsaz S, et al., 2008 [w/](#)) (Pierer M, et al., 2011 [w/](#)).

Sería interesante estudiar el uso de terapias bloqueantes específicas frente a TLR4 como TAK-242, en reciente desarrollo focalizado en estudios sobre shock séptico (Yamada M, et al., 2005 [w/](#)) (li M, et al., 2006 [w/](#)) (Matsunaga N, et al., 2010 [w/](#)).

Igualmente la combinación de terapias con inhibidores de fibrinogénesis y PADs o bloqueantes de TLR4 y PADs permitirían actuar a dos niveles del mismo proceso, una estrategia cuya utilidad está pendiente de ensayar (Jang B, et al., 2014 [w/](#)).

7. Principales limitaciones del estudio

Los estudios del transcriptoma en genoma completo se realizaron utilizando un sólo tiempo de estimulación. Este tiempo proporciona una especie de instantánea del proceso de activación celular, sin embargo limita la identificación de determinados genes con tiempos de activación diferentes. Además, el análisis transcriptómico se basa en establecer unas condiciones de sensibilidad baja, que aumentan el cociente señal/ruido. En nuestro caso, empleamos un filtro bidireccional 2x, lo que puede hacer que algunas inducciones relevantes no se pongan de manifiesto. Así mismo, con objeto de mejorar la especificidad de los datos, se consideran únicamente moléculas que estén presentes en todas las condiciones, excluyendo así las inducciones *de novo*, como las que pueden producirse durante las modificaciones epigenéticas. Esto puede ser la causa de la no detección de algunas moléculas asociadas a invasividad.

Otro grupo de limitaciones son los derivados de la muestra. Como se menciona en la sección de metodología, los tejidos se obtuvieron de pacientes sometidos a recambio protésico. Este origen presupone un estado evolucionado de la enfermedad, lo que limita la extrapolación de nuestros datos a lo que sucede en los eventos iniciales de la enfermedad, como sería nuestra intención. Por otra parte, los pacientes posiblemente hayan sido sometidos a múltiples tratamientos cuyos efectos en el comportamiento de las células *ex vivo* no están completamente dilucidados.

Finalmente, al ser la AR una enfermedad muy heterogénea, al no haberse realizado cribado hacia una subpoblación concreta de la enfermedad, existe una mayor variabilidad intrínseca en la intensidad de respuesta entre pacientes, y por ende de nuestras células. Esto dificulta el análisis estadístico de los datos, permitiendo a cambio la obtención de mecanismos más genéricos del proceso patológico, que puedan aplicarse a diferentes fenotipos de la enfermedad.

Por último, hay que mencionar que muchos ensayos se han realizado en un número limitado de cultivos/tejidos, por lo que el análisis de los datos en algunas situaciones carece de potencia estadística suficiente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La fibrina es capaz de generar una respuesta en FSAR con características proinflamatorias y proinvasivas.
2. El receptor principal de esta respuesta es TLR4, mediante activación de NFκB.
3. Esta respuesta se ve potenciada mediante citrulinación de la fibrina.
4. Aunque este tipo de respuesta no es exclusivo de AR, se ve incrementada por la sobreexpresión basal de este receptor en los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ABDOLLAHI**-Roodsaz S, Joosten LA, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, Heuvelmans-Jacobs M, Akira S, Nicklin MJ, Ribeiro-Dias F y van den Berg WB (2008). "Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis." *J Clin Invest* 118(1): 205-16.
- ACHARYA** NK, Nagele EP, Han M, Coretti NJ, DeMarshall C, Kosciuk MC, Boulos PA y Nagele RG (2012). "Neuronal PAD4 expression and protein citrullination: possible role in production of autoantibodies associated with neurodegenerative disease." *J Autoimmun* 38(4): 369-80.
- AHMED** S, Riegsecker S, Beamer M, Rahman A, Bellini JV, Bhansali P y Tillekeratne LM (2013). "Largazole, a class I histone deacetylase inhibitor, enhances TNF-alpha-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." *Toxicol Appl Pharmacol* 270(2): 87-96.
- AKIRA** S, Uematsu S y Takeuchi O (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124(4): 783-801.
- ALAMANOS** Y y Drosos AA (2005). "Epidemiology of adult rheumatoid arthritis." *Autoimmun Rev* 4(3): 130-6.
- ALEXOPOULOU** L, Holt AC, Medzhitov R y Flavell RA (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* 413(6857): 732-8.
- ALM** AK, Norstrom E, Sundelin J y Nystedt S (1999). "Stimulation of proteinase activated receptor-2 causes endothelial cells to promote blood coagulation in vitro." *Thromb Haemost* 81(6): 984-8.
- ALVAREZ**-Lafuente R, Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S, Jover JA, Rollin R, Loza E, Clemente D y Lamas JR (2005). "Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction." *Ann Rheum Dis* 64(9): 1357-9.
- ANDERSEN** RB y Gormsen J (1970). "Fibrinolytic and fibrin stabilizing activity of synovial membranes." *Ann Rheum Dis* 29(3): 287-93.
- ANOLIK** JH, Looney RJ, Lund FE, Randall TD y Sanz I (2009). "Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets." *Immunol Res* 45(2-3): 144-58.
- ARNETT** FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS y et al. (1988). "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 31(3): 315-24.
- ASEA** A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA y Calderwood SK (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." *J Biol Chem* 277(17): 15028-34.
- BACCALA** R, Gonzalez-Quintanilla R, Lawson BR, Stern ME, Kono DH, Beutler B y Theofilopoulos AN (2009). "Sensors of the innate immune system: their mode of action." *Nat Rev Rheumatol* 5(8): 448-56.
- BALANDRAUD** N, Roudier J y Roudier C (2004). "Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis." *Autoimmun Rev* 3(5): 362-7.
- BARLAND** P, Novikoff AB y Hamerman D (1962). "Electron microscopy of the human synovial membrane." *J Cell Biol* 14: 207-20.
- BARRA** LJ, Scinocca M, Wilson E, Summers K, Cairns E y Bell D (2011). Pathogenesis and prevalence of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in unaffected siblings of ACPA-positiverheumatoid arthritis patients. The European League Against Rheumatism, London (UK), *Ann Rheum Dis*.
- BARRERA** V, Skorokhod OA, Baci D, Gremo G, Arese P y Schwarzer E (2011). "Host fibrinogen stably bound to hemozoin rapidly activates monocytes via TLR-4 and CD11b/CD18-integrin: a new paradigm of hemozoin action." *Blood* 117(21): 5674-82.
- BARTOK** B y Firestein GS (2010). "Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis." *Immunol Rev* 233(1): 233-55.
- BASSAL** NK, Hughes BP y Costabile M (2012). "*Arachidonic acid and its COX1/2 metabolites inhibit interferon-gamma mediated induction of indoleamine-2,3 dioxygenase in THP-1 cells and human monocytes.*" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 87(4-5): 119-26.
- BEGOVIĆ** AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodin SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ y Gregersen PK (2004). "A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis." *Am J Hum Genet* 75(2): 330-7.
- BELCH** JJ, Madhok R, McArdle B, McLaughlin K, Kluft C, Forbes CD y Sturrock RD (1986). "The effect of increasing fibrinolysis in patients with rheumatoid arthritis: a double blind study of stanozolol." *Q J Med* 58(225): 19-27.
- BELLATIN** MF, Han M, Fallena M, Fan L, Xia D, Olsen N, Branch V, Karp D y Stastny P (2012). "Production of autoantibodies against citrullinated antigens/peptides by human B cells." *J Immunol* 188(7): 3542-50.
- BELTRAMI** A, Rossmann M, Fiorillo MT, Paladini F, Sorrentino R, Saenger W, Kumar P, Ziegler A y Uchanska-Ziegler B (2008). "Citrullination-dependent differential presentation of a self-peptide by HLA-B27 subtypes." *J Biol Chem* 283(40): 27189-99.

- BHATTACHARJEE** P y Bhattacharyya D (2014). An Insight into the Abnormal Fibrin Clots — Its Pathophysiological Roles. Fibrinolysis and Thrombolysis. Kolev K. Croatia InTech: 195.
- BIANCHI** ME (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." *J Leukoc Biol* 81(1): 1-5.
- BINI** A, Itoh Y, Kudryk BJ y Nagase H (1996). "Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1): hydrolysis of the gamma Gly 404-Ala 405 peptide bond." *Biochemistry* 35(40): 13056-63.
- BIRAGYN** A, Coscia M, Nagashima K, Sanford M, Young HA y Olkhanud P (2008). "Murine beta-defensin 2 promotes TLR-4/MyD88-mediated and NF-kappaB-dependent atypical death of APCs via activation of TNFR2." *J Leukoc Biol* 83(4): 998-1008.
- BIRAGYN** A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ y Kwak LW (2002). "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2." *Science* 298(5595): 1025-9.
- BLOOM** BJ, Tucker LB, Miller LC y Schaller JG (1998). "Fibrin D-dimer as a marker of disease activity in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 25(8): 1620-5.
- BOOTS** AM, Wimmers-Bertens AJ y Rijnders AW (1994). "Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts." *Immunology* 82(2): 268-74.
- BOTTINI** N y Firestein GS (2013). "Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors." *Nat Rev Rheumatol* 9(1): 24-33.
- BRAAT** EA, Jie AF, Runday HK, Beekman B y Rijken DC (2000). "Urokinase-mediated fibrinolysis in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients may be affected by the inactivation of single chain urokinase type plasminogen activator by thrombin." *Ann Rheum Dis* 59(4): 315-8.
- BRADFIELD** PF, Amft N, Vernon-Wilson E, Exley AE, Parsonage G, Rainger GE, Nash GB, Thomas AM, Simmons DL, Salmon M y Buckley CD (2003). "Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue." *Arthritis Rheum* 48(9): 2472-82.
- BULUT** Y, Faure E, Thomas L, Karahashi H, Michelsen KS, Equils O, Morrison SG, Morrison RP y Arditi M (2002). "Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway." *J Immunol* 168(3): 1435-40.
- BUSO** N, Morard C, Salvi R, Peclat V y So A (2003). "Role of the tissue factor pathway in synovial inflammation." *Arthritis Rheum* 48(3): 651-9.
- BUSO** N, Peclat V, Van Ness K, Kolodzieszyk E, Degen J, Bugge T y So A (1998). "Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice." *J Clin Invest* 102(1): 41-50.
- CAJIGAS** Melgoza JC, Robles San Román M y Ventura Ríos L (2011). *Artritis Reumatoide*. Manual de reumatología. Editorial Alfil SAdCV. México 61-80.
- CAÑETE** Crespillo JD, Gómez-Reino Carnota JJ, González-Gay Mantecón MA, Herrero-Beaumont Cuenca G, Morrillas López L, Pabblos Álvarez JL y Sanmartí Sala R (2008). *Manual SER de las enfermedades reumáticas*. Manual SER de las enfermedades reumáticas. Panamericana M. Madrid: 190-198.
- CARMONA** L, Gonzalez-Alvaro I, Balsa A, Angel Belmonte M, Tena X y Sanmarti R (2003). "Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity." *Ann Rheum Dis* 62(9): 897-900.
- CARTER** RA, Campbell IK, O'Donnel KL y Wicks IP (2002). "Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) blockade in collagen-induced arthritis reduces joint involvement and alters B cell trafficking." *Clin Exp Immunol* 128(1): 44-51.
- CASCAO** R, Moura RA, Perpetuo I, Canhao H, Vieira-Sousa E, Mourao AF, Rodrigues AM, Polido-Pereira J, Queiroz MV, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Graca L y Fonseca JE (2010). "Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 12(5): R196.
- CASTOR** CW (1960). "The microscopic structure of normal human synovial tissue." *Arthritis Rheum* 3: 140-51.
- CATAY** E, Del Cid CC, Narvaez L, Velozo EJ, Rosa JE, Catoggio LJ y Soriano ER (2012). "Cost of rheumatoid arthritis in a selected population from Argentina in the prebiologic therapy era." *Clinicoecon Outcomes Res* 4: 219-25.
- CAVASSANI** KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM y Kunkel SL (2008). "TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events." *J Exp Med* 205(11): 2609-21.
- CHALAN** P, Kroesen BJ, van der Geest KS, Huitema MG, Abdulahad WH, Bijzet J, Brouwer E y Boots AM (2013). "Circulating CD4+CD161+ T Lymphocytes Are Increased in Seropositive Arthralgia Patients but Decreased in Patients with Newly Diagnosed Rheumatoid Arthritis." *PLoS One* 8(11): e79370.
- CHANG** X, Yamada R, Sawada T, Suzuki A, Kochi Y y Yamamoto K (2005b). "The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 44(3): 293-8.
- CHANG** X, Yamada R, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T y Yamamoto K (2005c). "Citrullination of fibronectin in

rheumatoid arthritis synovial tissue." *Rheumatology (Oxford)* 44(11): 1374-82.

CHANG X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhira S y Yamamoto K (2005d). "Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 44(1): 40-50.

CHANG X, Yamada R y Yamamoto K (2005a). "Inhibition of antithrombin by hyaluronic acid may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 7(2): R268-73.

CHAPUY-Regaud S, Sebbag M, Baeten D, Clavel C, Foulquier C, De Keyser F y Serre G (2005). "Fibrin deimination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitis." *J Immunol* 174(8): 5057-64.

CHASE MA, Wheeler DS, Lierl KM, Hughes VS, Wong HR y Page K (2007). "Hsp72 induces inflammation and regulates cytokine production in airway epithelium through a TLR4- and NF-kappaB-dependent mechanism." *J Immunol* 179(9): 6318-24.

CHEN JS, Makovey J, Lassere M, Buchbinder R y March LM (2013). "Comparative effectiveness of anti-tumour necrosis factor (TNF) drugs on health-related quality of life among patients with inflammatory arthritis." *Arthritis Care Res (Hoboken)*.

CHENG N, He R, Tian J, Ye PP y Ye RD (2008). "Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A." *J Immunol* 181(1): 22-6.

CHERRINGTON BD, Zhang X, McElwee JL, Morency E, Anguish LJ y Coonrod SA (2012). "Potential role for PAD2 in gene regulation in breast cancer cells." *PLoS One* 7(7): e41242.

CHIBA T, Inoko H, Kimura M y Sato T (2013). "Role of nuclear Ikbabss in inflammation regulation." *Biomol Concepts* 4(2): 187-96.

CHIRON S, Tomczak C, Duperray A, Laine J, Bonne G, Eder A, Hansen A, Eschenhagen T, Verdier C y Coirault C (2012). "Complex interactions between human myoblasts and the surrounding 3D fibrin-based matrix." *PLoS One* 7(4): e36173.

CHIU YC, Fong YC, Lai CH, Hung CH, Hsu HC, Lee TS, Yang RS, Fu WM y Tang CH (2008). "Thrombin-induced IL-6 production in human synovial fibroblasts is mediated by PAR1, phospholipase C, protein kinase C alpha, c-Src, NF-kappa B and p300 pathway." *Mol Immunol* 45(6): 1587-99.

CHUN KH y Seong SY (2009). "CD14 but not MD2 transmit signals from DAMP." *Int Immunopharmacol* 10(1): 98-106.

CLARK RA (2001). "Fibrin and wound healing." *Ann N Y Acad Sci* 936: 355-67.

CLEMMENSEN I, Holund B y Andersen RB (1983). "Fibrin and fibronectin in rheumatoid synovial membrane and rheumatoid synovial fluid." *Arthritis Rheum* 26(4): 479-85.

COOK AD, Braine EL, Campbell IK y Hamilton JA (2002). "Differing roles for urokinase and tissue-type plasminogen activator in collagen-induced arthritis." *Am J Pathol* 160(3): 917-26.

COOK-Mills JM, Marchese ME y Abdala-Valencia H (2010). "Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants." *Antioxid Redox Signal* 15(6): 1607-38.

COPE AP, Schulze-Koops H y Aringer M (2007). "The central role of T cells in rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 25(5 Suppl 46): S4-11.

CROCE K, Gao H, Wang Y, Mooroka T, Sakuma M, Shi C, Sukhova GK, Packard RR, Hogg N, Libby P y Simon DI (2009). "Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury." *Circulation* 120(5): 427-36.

CROFFORD LJ (1997). "COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions." *J Rheumatol Suppl* 49: 15-9.

CURTIN JF, Liu N, Candolfi M, Xiong W, Assi H, Yagiz K, Edwards MR, Michelsen KS, Kroeger KM, Liu C, Muhammad AK, Clark MC, Arditi M, Comin-Anduix B, Ribas A, Lowenstein PR y Castro MG (2009). "HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression." *PLoS Med* 6(1): e10.

DA SYLVA TR, Connor A, Mburu Y, Keystone E y Wu GE (2005). "Somatic mutations in the mitochondria of rheumatoid arthritis synoviocytes." *Arthritis Res Ther* 7(4): R844-51.

DARRAH E, Rosen A, Giles JT y Andrade F (2011). "Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have distinct specificities against cellular substrates: novel insights into autoantigen selection in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 71(1): 92-8.

DE AGUILAR C, Costa MG y Verli H (2014). "Dynamics on human Toll-like receptor 4 complexation to MD-2: the coreceptor stabilizing function." *Proteins* 83(2): 373-82.

DIAZ-Gonzalez JF y Ferraz Amaro I (2007). "[The B cell in the pathogenesis of rheumatoid arthritis]." *Reumatol Clin* 3(4): 176-82.

DING YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY y Yang L (2003). "Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma." *World J Gastroenterol* 9(7): 1409-14.

DOMÍNGUEZ A (2003). "Costes asociados a la artritis reumatoide." *Revista Española de Economía de la Salud* 2(4): 6.

DOUNI E, Akassoglou K, Alexopoulou L, Georgopoulos S, Haralambous S, Hill S, Kassiotis G, Kontoyiannis D,

- Pasparakis M, Plows D, Probert L y Kollias G (1995). "Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis." *J Inflamm* 47(1-2): 27-38.
- DOYLE** SL y O'Neill LA (2006). "Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity." *Biochem Pharmacol* 72(9): 1102-13.
- DREXLER** SK, Kong PL, Wales J y Foxwell BM (2008). "Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 10(5): 216.
- DYBDAHL** B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T y Sundan A (2002). "Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4." *Circulation* 105(6): 685-90.
- ESTRADA**-Capetillo L, Hernandez-Castro B, Monsivais-Urenda A, Alvarez-Quiroga C, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, Baranda L, Urzainqui A, Sanchez-Madrid F y Gonzalez-Amaro R (2013). "Induction of Th17 lymphocytes and Treg cells by monocyte-derived dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus." *Clin Dev Immunol* 2013: 584303.
- FANG** J, Fang D, Silver PB, Wen F, Li B, Ren X, Lin Q, Caspi RR y Su SB (2010). "The role of TLR2, TLR4, and TLR9 signaling in the pathogenesis of autoimmune disease in a retinal autoimmunity model." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(6): 3092-9.
- FAUCI** AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL y Loscalzo J (2008). *Harrison Principios de medicina interna. Harrison Principios de medicina interna*. Hill MG. Mexico. 2: 2083-2094.
- FIRESTEIN** GS (1996). "Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors?" *Arthritis Rheum* 39(11): 1781-90.
- FIRESTEIN** GS (2004). "The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis." *J Clin Invest* 114(4): 471-4.
- FIRESTEIN** GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ y Green DR (1997). "Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10895-900.
- FIRESTEIN** GS y Zvaifler NJ (2002). "How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end." *Arthritis Rheum* 46(2): 298-308.
- FLOWER** RJ (2003). "The development of COX2 inhibitors." *Nat Rev Drug Discov* 2(3): 179-91.
- FOULQUIER** C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Mechine MC, Vincent C, Nachat R, Yamada M, Takahara H, Simon M, Guerrin M y Serre G (2007). "Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation." *Arthritis Rheum* 56(11): 3541-53.
- FURUHASHI** I, Abe K, Sato T y Inoue H (2008). "Thrombin-stimulated proliferation of cultured human synovial fibroblasts through proteolytic activation of proteinase-activated receptor-1." *J Pharmacol Sci* 108(1): 104-11.
- GABRIEL** D, Lange N, Chobaz-Peclat V, Zuluaga MF, Gurny R, van den Bergh H y Busso N (2012). "Thrombin-sensitive dual fluorescence imaging and therapeutic agent for detection and treatment of synovial inflammation in murine rheumatoid arthritis." *J Control Release* 163(2): 178-86.
- GABRIEL** SE (2008). "Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis." *Am J Med* 121(10 Suppl 1): S9-14.
- GAFFO** A, Saag KG y Curtis JR (2006). "Treatment of rheumatoid arthritis." *Am J Health Syst Pharm* 63(24): 2451-65.
- GARDINER** EE y D'Souza SE (1999). "Sequences within fibrinogen and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) modulate signals required for mitogenesis." *J Biol Chem* 274(17): 11930-6.
- GERARD** C, Forest MA, Beauregard G, Skuk D y Tremblay JP (2011). "Fibrin gel improves the survival of transplanted myoblasts." *Cell Transplant* 21(1): 127-37.
- GIERUT** A, Perlman H y Pope RM (2010). "Innate immunity and rheumatoid arthritis." *Rheum Dis Clin North Am* 36(2): 271-96.
- GILMORE** Lab. (2011). "*NF-kB Transcription Factors*." 2012, from <http://www.bu.edu/nf-kb/>.
- GONZALEZ**-Rey E, Fernandez-Martin A, Chorny A y Delgado M (2006). "Vasoactive intestinal peptide induces CD4+, CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis." *Arthritis Rheum* 54(3): 864-76.
- GOOD** DW, George T y Watts BA, 3rd (2012). "Toll-like receptor 2 is required for LPS-induced Toll-like receptor 4 signaling and inhibition of ion transport in renal thick ascending limb." *J Biol Chem* 287(24): 20208-20.
- GRAVALLESE** EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS y Goldring SR (1998). "Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis." *Am J Pathol* 152(4): 943-51.
- GREILING** D y Clark RA (1997). "Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix." *J Cell Sci* 110 (Pt 7): 861-70.
- GUERNE** PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA y Lotz M (1989). "Synovium as a source of interleukin 6 in vitro.

Contribution to local and systemic manifestations of arthritis." *J Clin Invest* 83(2): 585-92.

GUILLOT L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M y Si-Tahar M (2002). "Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4." *J Immunol* 168(12): 5989-92.

GUTIERREZ S, Palacios I, Egido J, Zarco P, Miguelez R, Gonzalez E y Herrero-Beaumont G (1995). "IL-1 beta and IL-6 stimulate the production of platelet-activating factor (PAF) by cultured rabbit synovial cells." *Clin Exp Immunol* 99(3): 364-8.

HANAOKA R, Kasama T, Muramatsu M, Yajima N, Shiozawa F, Miwa Y, Negishi M, Ide H, Miyaoka H, Uchida H y Adachi M (2003). "A novel mechanism for the regulation of IFN-gamma inducible protein-10 expression in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 5(2): R74-81.

HAYASHI F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM y Aderem A (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* 410(6832): 1099-103.

HAYEN W, Goebeler M, Kumar S, Riessen R y Nehls V (1999). "Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture." *J Cell Sci* 112 (Pt 13): 2241-51.

HEMMI H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K y Akira S (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7/MyD88-dependent signaling pathway." *Nat Immunol* 3(2): 196-200.

HEMMI H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K y Akira S (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* 408(6813): 740-5.

HODGKINSON CP, Patel K y Ye S (2008). "Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen." *Thromb Haemost* 100(2): 301-7.

HODGKINSON CP, Patel K y Ye S (2008). "Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen." *Thromb Haemost* 100(2): 301-7.

HOTARY KB, Yana I, Sabeh F, Li XY, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Allen ED, Hiraoka N y Weiss SJ (2002). "Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes." *J Exp Med* 195(3): 295-308.

HUANG CY, Lin HJ, Chen HS, Cheng SY, Hsu HC y Tang CH (2013). "Thrombin promotes matrix metalloproteinase-13 expression through the PKCdelta c-Src/EGFR/PI3K/Akt/AP-1 signaling pathway in human chondrocytes." *Mediators Inflamm* 2013: 326041.

HUBER LC, Brock M, Hemmatazad H, Giger OT, Moritz F, Trenkmann M, Distler JH, Gay RE, Kolling C, Moch H, Michel

BA, Gay S, Distler O y Jungel A (2007). "Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients." *Arthritis Rheum* 56(4): 1087-93.

ICHIKAWA Y, Hoshina Y, Horiki T, Yamada C, Uchiyama M y Takaya M (1997). Molecular markers of coagulation and fibrinolysis as indicators for the disease activity of rheumatoid arthritis, *Japanese Journal of Rheumatology*. 7: 173-181.

II M, Matsunaga N, Hazeki K, Nakamura K, Takashima K, Seya T, Hazeki O, Kitazaki T y Iizawa Y (2006). "A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling." *Mol Pharmacol* 69(4): 1288-95.

IMAI Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, Ermolaeva M, Veldhuizen R, Leung YH, Wang H, Liu H, Sun Y, Pasparakis M, Kopf M, Mech C, Bavari S, Peiris JS, Slutsky AS, Akira S, Hultqvist M, Holmdahl R, Nicholls J, Jiang C, Binder CJ y Penninger JM (2008). "Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury." *Cell* 133(2): 235-49.

IRELAND JM y Unanue ER (2011). "Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells." *J Exp Med* 208(13): 2625-32.

ISHIGAMI A, Ohsawa T, Hiratsuka M, Taguchi H, Kobayashi S, Saito Y, Murayama S, Asaga H, Toda T, Kimura N y Maruyama N (2005). "Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease." *J Neurosci Res* 80(1): 120-8.

IWANAGA T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H y Nozawa-Inoue K (2000). "Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint." *Arch Histol Cytol* 63(1): 17-31.

IWATA Y, Yoshizaki A, Komura K, Shimizu K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Bae S, Takenaka M, Yukami T, Hasegawa M, Fujimoto M, Tomita Y, Tedder TF y Sato S (2009). "CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling." *Am J Pathol* 175(2): 649-60.

JANG B, Kim HW, Kim JS, Kim WS, Lee BR, Kim S, Kim H, Han SJ, Ha SJ y Shin SJ (2014). "Peptidylarginine deiminase inhibition impairs Toll-like receptor agonist-induced functional maturation of dendritic cells, resulting in the loss of T cell-proliferative capacity: a partial mechanism with therapeutic potential in inflammatory settings." *J Leukoc Biol* 97(2): 351-62.

JIANG D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R y Noble PW (2005). "Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan." *Nat Med* 11(11): 1173-9.

- JOHNSON** GB, Brunn GJ, Kodaira Y y Platt JL (2002). "Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4." *J Immunol* 168(10): 5233-9.
- JOHNSON** GB, Brunn GJ y Platt JL (2004). "Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4." *J Immunol* 172(1): 20-4.
- JOOSTEN** LA, Koenders MI, Smeets RL, Heuvelmans-Jacobs M, Helsen MM, Takeda K, Akira S, Lubberts E, van de Loo FA y van den Berg WB (2003). "Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88." *J Immunol* 171(11): 6145-53.
- JUDEX** MO y Mueller BM (2005). "Plasminogen activation/plasmin in rheumatoid arthritis: matrix degradation and more." *Am J Pathol* 166(3): 645-7.
- JURK** M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G y Bauer S (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." *Nat Immunol* 3(6): 499.
- KARIKO** K, Ni H, Capodici J, Lamphier M y Weissman D (2004). "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3." *J Biol Chem* 279(13): 12542-50.
- KAROUZAKIS** E, Gay RE, Michel BA, Gay S y Neidhart M (2009). "DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." *Arthritis Rheum* 60(12): 3613-22.
- KAVANAUGH** AF, Davis LS, Jain RI, Nichols LA, Norris SH y Lipsky PE (1996). "A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1;CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 23(8): 1338-44.
- KEFFER** J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D y Kollias G (1991). "Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis." *EMBO J* 10(13): 4025-31.
- KELLY** KM, Zhuang H, Nacionales DC, Scumpia PO, Lyons R, Akaogi J, Lee P, Williams B, Yamamoto M, Akira S, Satoh M y Reeves WH (2006). ""Endogenous adjuvant" activity of the RNA components of lupus autoantigens Sm/RNP and Ro 60." *Arthritis Rheum* 54(5): 1557-67.
- KEY** JA (1928). The synovial membrane of joints and bursae. *Special Cytology*. Cowdry EV e. New York:Hoeber P.B.: 1054-74.
- KIENER** HP, Watts GF, Cui Y, Wright J, Thornhill TS, Skold M, Behar SM, Niederreiter B, Lu J, Cernadas M, Coyle AJ, Sims GP, Smolen J, Warman ML, Brenner MB y Lee DM (2010). "Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture." *Arthritis Rheum* 62(3): 742-52.
- KINLOCH** A, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, Zendman AJ, Saxne T, Malmstrom V y Venables PJ (2008). "Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis." *Arthritis Rheum* 58(8): 2287-95.
- KINNE** RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E y Burmester GR (2000). "Macrophages in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res* 2(3): 189-202.
- KLEIN** K, Ospelt C y Gay S (2012). "Epigenetic contributions in the development of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 14(6): 227.
- KLIMIUK** PA, Sierakowski S, Latosiewicz R, Cylwik JP, Cylwik B, Skowronski J y Chwiecko J (2002). "Soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with distinct variants of rheumatoid synovitis." *Ann Rheum Dis* 61(9): 804-9.
- KNIGHT** JS, Zhao W, Luo W, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, Hodgins JB, Eitzman DT, Thompson PR y Kaplan MJ (2013). "Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus." *J Clin Invest* 123(7): 2981-93.
- KOMATSU** N y Takayanagi H (2012). "Inflammation and bone destruction in arthritis: synergistic activity of immune and mesenchymal cells in joints." *Front Immunol* 3: 77.
- KORB** A, Pavenstadt H y Pap T (2009). "Cell death in rheumatoid arthritis." *Apoptosis* 14(4): 447-54.
- KORESSAAR** T y Remm M (2007). "Enhancements and modifications of primer design program Primer3." *Bioinformatics* 23(10): 1289-1291.
- KUMI**-Diaka J, Saddler-Shawnette S, Aller A y Brown J (2004). "Potential mechanism of phytochemical-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells: Therapeutic synergy in genistein and beta-lapachone combination treatment." *Cancer Cell Int* 4(1): 5.
- KWAK** HB, Ha H, Kim HN, Lee JH, Kim HS, Lee S, Kim HM, Kim JY, Kim HH, Song YW y Lee ZH (2008). "Reciprocal cross-talk between RANKL and interferon-gamma-inducible protein 10 is responsible for bone-erosive experimental arthritis." *Arthritis Rheum* 58(5): 1332-42.
- KWASNY-KROCHIN** B, Glusko P y Undas A (2010). "Unfavorably altered fibrin clot properties in patients with active rheumatoid arthritis." *Thromb Res* 126(1): e11-6.
- LAEMMLI** UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- LAJAS** C, Abasolo L, Bellajdel B, Hernandez-Garcia C, Carmona L, Vargas E, Lazaro P y Jover JA (2003). "Costs and predictors of costs in rheumatoid arthritis: a prevalence-based study." *Arthritis Rheum* 49(1): 64-70.

- LAU** CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, Christensen SR, Shlomchik MJ, Viglianti GA, Rifkin IR y Marshak-Rothstein A (2005). "RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement." *J Exp Med* 202(9): 1171-7.
- LEADBETTER** EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ y Marshak-Rothstein A (2002). "Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors." *Nature* 416(6881): 603-7.
- LEE** DM y Weinblatt ME (2001). "Rheumatoid arthritis." *Lancet* 358(9285): 903-11.
- LEE** KS, Scanga CA, Bachelder EM, Chen Q y Snapper CM (2007). "TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*." *Cell Immunol* 245(2): 103-10.
- LEFEVRE** S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnaker EM, Tarner IH, Robbins PD, Evans CH, Sturz H, Steinmeyer J, Gay S, Scholmerich J, Pap T, Muller-Ladner U y Neumann E (2009). "Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints." *Nat Med* 15(12): 1414-20.
- LEHNARDT** S, Schott E, Trimbuch T, Laubisch D, Krueger C, Wulczyn G, Nitsch R y Weber JR (2008). "A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS." *J Neurosci* 28(10): 2320-31.
- LI** J, Ny A, Leonardsson G, Nandakumar KS, Holmdahl R y Ny T (2005). "The plasminogen activator/plasmin system is essential for development of the joint inflammatory phase of collagen type II-induced arthritis." *Am J Pathol* 166(3): 783-92.
- LI** P, Sanz I, O'Keefe RJ y Schwarz EM (2000). "NF-kappa B regulates VCAM-1 expression on fibroblast-like synoviocytes." *J Immunol* 164(11): 5990-7.
- LI** X y Makarov SS (2006). "An essential role of NF-kappaB in the "tumor-like" phenotype of arthritic synoviocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46): 17432-7.
- LIN** CH, Cheng HW, Hsu MJ, Chen MC, Lin CC y Chen BC (2006). "c-Src mediates thrombin-induced NF-kappaB activation and IL-8/CXCL8 expression in lung epithelial cells." *J Immunol* 177(5): 3427-38.
- LIU** X y Piela-Smith TH (2000). "Fibrin(ogen)-induced expression of ICAM-1 and chemokines in human synovial fibroblasts." *J Immunol* 165(9): 5255-61.
- LIU** Y, Yin H, Zhao M y Lu Q (2013). "TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review." *Clin Rev Allergy Immunol* 47(2): 136-47.
- LIU-Bryan** R, Pritzker K, Firestein GS y Terkeltaub R (2005a). "TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation." *J Immunol* 174(8): 5016-23.
- LIU-Bryan** R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM y Terkeltaub R (2005b). "Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation." *Arthritis Rheum* 52(9): 2936-46.
- LUND** JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A y Flavell RA (2004). "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15): 5598-603.
- MACGREGOR** AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K y Silman AJ (2000). "Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins." *Arthritis Rheum* 43(1): 30-7.
- MANIVELAVAN** D y Vijayasamundeeswari CK (2012). "Anticyclic citrullinated Peptide antibody: an early diagnostic and prognostic biomarker of rheumatoid arthritis." *J Clin Diagn Res* 6(8): 1393-6.
- MARCOS** J, Waimann C, Dal Pra F, Hogrefe J, Retamozo S, Caeiro F, Casalla L, Benegas M, Rillo O, Spindler A, Berman H, Berman A, Secco A, Garcia Salinas R, Catalan Pellet A, Ceccato F, Paira S, Marcos JC, Maldonado Cocco JA y Citera G (2011). "General characteristics of an early arthritis cohort in Argentina." *Rheumatology (Oxford)* 50(1): 110-6.
- MARTY** I, Peclat V, Kirdaite G, Salvi R, So A y Busso N (2001). "Amelioration of collagen-induced arthritis by thrombin inhibition." *J Clin Invest* 107(5): 631-40.
- MARUOTTI** N, Annese T, Cantatore FP y Ribatti D (2013). "Macrophages and angiogenesis in rheumatic diseases." *Vasc Cell* 5(1): 11.
- MARUOTTI** N, Cantatore FP, Crivellato E, Vacca A y Ribatti D (2007). "Macrophages in rheumatoid arthritis." *Histol Histopathol* 22(5): 581-6.
- MASUDA** T, Hattori N, Senoo T, Akita S, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H y Kohno N (2013). "SK-216, an inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1, limits tumor progression and angiogenesis." *Mol Cancer Ther* 12(11): 2378-88.
- MATMATI** M, Jacques P, Maelfait J, Verheugen E, Kool M, Sze M, Geboes L, Louagie E, Mc Guire C, Vereecke L, Chu Y, Boon L, Staelens S, Matthys P, Lambrecht BN, Schmidt-Suprian M, Pasparakis M, Elewaut D, Beyaert R y van Loo G (2011). "A20 (TNFAIP3) deficiency in myeloid cells triggers erosive polyarthritis resembling rheumatoid arthritis." *Nat Genet* 43(9): 908-12.
- MATSUNAGA** N, Tsuchimori N, Matsumoto T y Li M (2010). "TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules." *Mol Pharmacol* 79(1): 34-41.

MCINNES IB, Leung BP y Liew FY (2000). "Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T lymphocytes and synovial cells." *Arthritis Res* 2(5): 374-8.

MCINNES IB y Schett G (2011). "The pathogenesis of rheumatoid arthritis." *N Engl J Med* 365(23): 2205-19.

MCQUEEN FM y Issa S (2013). "Is rheumatoid arthritis a B-cell haematological disease with a predilection for the joints? Following the B cell thread to its logical conclusion." *Med Hypotheses* 82(3): 266-70.

MECHTCHERIAKOVA D, Wlachos A, Holzmüller H, Binder BR y Hofer E (1999). "Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1." *Blood* 93(11): 3811-23.

MEINECKE I, Cinski A, Baier A, Peters MA, Dankbar B, Wille A, Drynda A, Mendoza H, Gay RE, Hay RT, Ink B, Gay S y Pap T (2007). "Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12): 5073-8.

MELZAK KA, Sherwood CS, Turner RFB y Haynes CA (1996). "Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions." *Journal of Colloid and Interface Science* 181(2): 635-644.

MERA Varela A, Blanco Rodríguez J y Caamano Freire M (2003). "[Approximation to the cost of pharmacological treatment of rheumatoid arthritis in Spain]." *An Med Interna* 20(3): 114-21.

MIDWOOD K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebaul A, Chan E, Drexler S, Sofat N, Kashiwagi M, Orend G, Brennan F y Foxwell B (2009). "Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease." *Nat Med* 15(7): 774-80.

MIKULS TR (2003). "Co-morbidity in rheumatoid arthritis." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17(5): 729-52.

MIKULS TR, Gould KA, Bynote KK, Yu F, Levan TD, Thiele GM, Michaud KD, O'Dell JR, Reimold AM, Hooker R, Caplan L, Johnson DS, Kerr G, Richards JS, Cannon GW, Criswell LA, Noble JA, Bridges SL, Jr., Hughes L y Gregersen PK (2010). "Anticitrullinated protein antibody (ACPA) in rheumatoid arthritis: influence of an interaction between HLA-DRB1 shared epitope and a deletion polymorphism in glutathione S-transferase in a cross-sectional study." *Arthritis Res Ther* 12(6): R213.

MILLER MC, Manning HB, Jain A, Troeberg L, Dudhia J, Essex D, Sandison A, Seiki M, Nanchahal J, Nagase H y Itoh Y (2009). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 60(3): 686-97.

MOHALE DS, Tripathi AS, Wahane JB y Chandewar AV (2014). "A Pharmacological Review on Cyclooxygenase Enzyme." *Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1(1): 13.

MONTES A, Perez-Pampin E, Calaza M, Gomez-Reino JJ y Gonzalez A (2012). "Association of anti-citrullinated vimentin and anti-citrullinated alpha-enolase antibodies with subsets of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 64(10): 3102-10.

MOTOJIMA M, Matsusaka T, Kon V y Ichikawa I (2009). "Fibrinogen that appears in Bowman's space of proteinuric kidneys in vivo activates podocyte Toll-like receptors 2 and 4 in vitro." *Nephron Exp Nephrol* 114(2): e39-47.

MULLER-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE y Gay S (1996). "Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice." *Am J Pathol* 149(5): 1607-15.

MULLER-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O y Pap T (2007). "Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts." *Arthritis Res Ther* 9(6): 223.

MYASOEDOVA E, Davis JM, 3rd, Crowson CS y Gabriel SE (2010). "Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality." *Curr Rheumatol Rep* 12(5): 379-85.

NAITO M (2000). "[Effects of fibrinogen, fibrin and their degradation products on the behaviour of vascular smooth muscle cells]." *Nihon Ronen Igakkai Zasshi* 37(6): 458-63.

NAKANO K, Boyle DL y Firestein GS (2013). "Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synovial cells." *J Immunol* 190(3): 1297-303.

NAKANO K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W y Firestein GS (2012). "DNA methylome signature in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 72(1): 110-7.

NARANJO Hernández A (1999). *Manual de reumatología clínica*. Las Palmas de Gran Canaria, Servicio de Publicaciones Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

NASTASE A, Paslaru L, Niculescu AM, Ionescu M, Dumitrascu T, Herlea V, Dima S, Gheorghe C, Lazar V y Popescu I (2011). "Prognostic and predictive potential molecular biomarkers in colon cancer." *Chirurgia (Bucur)* 106(2): 177-85.

NAVARRO-HERNANDEZ RE, Oregon-Romero E, Vazquez-Del Mercado M, Rangel-Villalobos H, Palafox-Sanchez CA y Munoz-Valle JF (2009). "Expression of ICAM1 and VCAM1 serum levels in rheumatoid arthritis clinical activity. Association with genetic polymorphisms." *Dis Markers* 26(3): 119-26.

NEUMANN E, Lefevre S, Zimmermann B, Geyer M, Lehr A, Umscheid T, Schonburg M, Rehart S y Muller-Ladner U (2010). "Migratory potential of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: additional perspectives." *Cell Cycle* 9(12): 2286-91.

NG CT, Biniecka M, Kennedy A, McCormick J, Fitzgerald O, Bresnihan B, Buggy D, Taylor CT, O'Sullivan J, Fearon U y

Veale DJ (2010). "Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo." *Ann Rheum Dis* 69(7): 1389-95.

NIELEN MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP y Dijkmans BA (2004). "Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors." *Arthritis Rheum* 50(2): 380-6.

NIENHUIS RL y Mandema E (1964). "A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor." *Ann Rheum Dis* 23: 302-5.

NILE CJ, Read RC, Akil M, Duff GW y Wilson AG (2008). "Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 58(9): 2686-93.

NIU Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY y Wang LL (2011). "Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis." *Rheumatol Int* 32(9): 2731-6.

NOMURA H, Naito M, Iguchi A, Thompson WD y Smith EB (1999). "Fibrin gel induces the migration of smooth muscle cells from rabbit aortic explants." *Thromb Haemost* 82(4): 1347-52.

OGRENDIK M (2013). "Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease caused by periodontal pathogens." *Int J Gen Med* 6: 383-6.

OHASHI K, Burkart V, Flohe S y Kolb H (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." *J Immunol* 164(2): 558-61.

OKADA T, Hawley RG, Kodaka M y Okuno H (1999). "Significance of VLA-4-VCAM-1 interaction and CD44 for transendothelial invasion in a bone marrow metastatic myeloma model." *Clin Exp Metastasis* 17(7): 623-9.

OKAMURA Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC y Strauss JF, 3rd (2001). "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4." *J Biol Chem* 276(13): 10229-33.

OLIVARES Martinez E, Hernandez Ramirez DF, Nunez-Alvarez CA y Cabiedes J (2009). "[Citruinated proteins in rheumatoid arthritis]." *Reumatol Clin* 7(1): 68-71.

OOSTING M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschuere IC, Arts P, Garritsen A, van Eenennaam H, Sturm P, Kullberg BJ, Hoischen A, Adema GJ, van der Meer JW, Netea MG y Joosten LA (2014). "Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(42): E4478-84.

ORDONEZ A, Martinez-Martinez I, Corrales FJ, Miqueo C, Minano A, Vicente V y Corral J (2009). "Effect of citrullination on the function and conformation of antithrombin." *FEBS J* 276(22): 6763-72.

OSPELT C y Gay S (2008). "The role of resident synovial cells in destructive arthritis." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(2): 239-52.

OZINSKY A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L y Aderem A (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13766-71.

PABLOS Alvarez JL (2009). "[Interleukin 6 in the physiopathology of rheumatoid arthritis]." *Reumatol Clin* 5(1): 34-9.

PABLOS Alvarez JL (2011). "[Participation of T lymphocytes in the development and perpetuation of rheumatoid arthritis]." *Reumatol Clin* 7(6): 352-3.

PÁEZ MC, Gómez LM y Anaya JM (2006). "Functional implications of B lymphocytes in the development of rheumatoid arthritis." *MedUNAB* 9: 34-44.

PALUMBO JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL y Bugge TH (2000). "Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells." *Blood* 96(10): 3302-9.

PALUMBO JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Jirouskova M y Degen JL (2005). "Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells." *Blood* 105(1): 178-85.

PAP T, Cinski A, Drynda A, Wille A, Baier A, Gay S y Meinecke I (2005). Regulating apoptosis in fibroblasts. 25th European Workshop for Rheumatology Research. Ltd BC. Glasgow, UK, *Arthritis Res Ther.* . 7: 1.

PARAMESWARAN N y Patial S (2010). "Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20(2): 87-103.

PARK JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A y Abraham E (2004). "Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein." *J Biol Chem* 279(9): 7370-7.

PAWAR RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S y Anders HJ (2007). "Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus." *J Am Soc Nephrol* 18(6): 1721-31.

PAWLOWSKA J, Smolenska Z, Daca A, Witkowski JM y Bryl E (2010). "Older age of rheumatoid arthritis onset is associated with higher activation status of peripheral blood CD4(+) T cells and disease activity." *Clin Exp Immunol* 163(2): 157-64.

PERVEEN K, Hanif F, Jawed H, Jamall S y Simjee SU (2014). "N-(2-hydroxy phenyl) acetamide: a novel suppressor of

Toll-like receptors (TLR-2 and TLR-4) in adjuvant-induced arthritic rats." *Mol Cell Biochem* 394(1-2): 67-75.

PIERER M, Muller-Ladner U, Pap T, Neidhart M, Gay RE y Gay S (2003). "The SCID mouse model: novel therapeutic targets - lessons from gene transfer." *Springer Semin Immunopathol* 25(1): 65-78.

PIERER M, Wagner U, Rossol M y Ibrahim S (2011). "Toll-like receptor 4 is involved in inflammatory and joint destructive pathways in collagen-induced arthritis in DBA1J mice." *PLoS One* 6(8): e23539.

PLUSKOTA E y D'Souza SE (2000). "Fibrinogen interactions with ICAM-1 (CD54) regulate endothelial cell survival." *Eur J Biochem* 267(15): 4693-704.

POLTORAK A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B y Beutler B (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* 282(5396): 2085-8.

PRETORIUS E, Oberholzer HM, van der Spuy WJ, Swanepoel AC y Soma P (2011). "Scanning electron microscopy of fibrin networks in rheumatoid arthritis: a qualitative analysis." *Rheumatol Int* 32(6): 1611-5.

PRYSTUPA A, Boguszewska-Czubara A, Bojarska-Junak A, Torun-Jurkowska A, Rolinski J y Zaluska W (2015). "Activity of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 in serum as a marker of progression of alcoholic liver disease in people from Lublin Region, eastern Poland." *Ann Agric Environ Med* 22(2): 325-8.

PUSZCZEWICZ M y Iwaszkiewicz C (2011). "Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis." *Arch Med Sci* 7(2): 189-94.

QI J, Goralnick S y Kreutzer DL (1997). "Fibrin regulation of interleukin-8 gene expression in human vascular endothelial cells." *Blood* 90(9): 3595-602.

QUIRKE AM, Fisher BA, Kinloch AJ y Venables PJ (2011). "Citrullination of autoantigens: upstream of TNFalpha in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *FEBS Lett* 585(23): 3681-8.

RADNER H, Smolen JS y Aletaha D (2010). "Comorbidity affects all domains of physical function and quality of life in patients with rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 50(2): 381-8.

RADSTAKE TR, Roelofs MF, Jenniskens YM, Oppers-Walgreen B, van Riel PL, Barrera P, Joosten LA y van den Berg WB (2004). "Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma." *Arthritis Rheum* 50(12): 3856-65.

RAIJMAKERS R, van Beers JJ, El-Azzouny M, Visser NF, Bozic B, Pruijn GJ y Heck AJ (2012). "Elevated levels of fibrinogen-

derived endogenous citrullinated peptides in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients." *Arthritis Res Ther* 14(3): R114.

RANTAPAA-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U y van Venrooij WJ (2003). "Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 48(10): 2741-9.

RAZA K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, Lord JM, Gordon C, Buckley CD y Salmon M (2005). "Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin." *Arthritis Res Ther* 7(4): R784-95.

RINTELEN B, Sautner J, Haindl P, Mai H, Brezinschek HP y Leeb BF (2013). "Remission in rheumatoid arthritis: a comparison of the 2 newly proposed ACR/EULAR remission criteria with the rheumatoid arthritis disease activity index-5, a patient self-report disease activity index." *J Rheumatol* 40(4): 394-400.

ROELOFS MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB y Radstake TR (2006). "Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *J Immunol* 176(11): 7021-7.

ROPES MW, Bennett GA y Bauer W (1939). "The Origin and Nature of Normal Synovial Fluid." *J Clin Invest* 18(3): 351-72.

ROSS KA (2011). "Evidence for somatic gene conversion and deletion in bipolar disorder, Crohn's disease, coronary artery disease, hypertension, rheumatoid arthritis, type-1 diabetes, and type-2 diabetes." *BMC Med* 9: 12.

RUIZ-Montesinos MD, Hernandez-Cruz B, Ariza-Ariza R, Carmona L, Ballina J y Navarro-Sarabia F (2005). "[Cost analysis in a cohort of rheumatoid arthritis patients managed in rheumatology units in Spain]." *Reumatol Clin* 1(4): 193-9.

RYBARCZYK BJ, Lawrence SO y Simpson-Haidaris PJ (2003). "Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration." *Blood* 102(12): 4035-43.

RYU JK, Petersen MA, Murray SG, Baeten KM, Meyer-Franke A, Chan JP, Vagena E, Bedard C, Machado MR, Rios Coronado PE, Prod'homme T, Charo IF, Lassmann H, Degen JL, Zamvil SS y Akassoglou K (2015). "Blood coagulation protein fibrinogen promotes autoimmunity and demyelination via chemokine release and antigen presentation." *Nat Commun* 6: 8164.

SABULSKI MJ, Wang Y y Pires MM (2015). "PAD2 Activity Monitored via a Fluorescent Substrate Analog." *Chem Biol Drug Des* 86(4): 599-605.

- SAHNI** A y Francis CW (2000). "Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation." *Blood* 96(12): 3772-8.
- SAHNI** A, Guo M, Sahni SK y Francis CW (2004). "Interleukin-1beta but not IL-1alpha binds to fibrinogen and fibrin and has enhanced activity in the bound form." *Blood* 104(2): 409-14.
- SAHNI** A, Odrlić T y Francis CW (1998). "Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin." *J Biol Chem* 273(13): 7554-9.
- SALVI** R, Peclat V, So A y Busso N (2000). "Enhanced expression of genes involved in coagulation and fibrinolysis in murine arthritis." *Arthritis Res* 2(6): 504-12.
- SANCHEZ-Pernaute** O (2010). "[Epigenetic therapies, a step beyond biologics for rheumatoid arthritis]." *Reumatol Clin* 6(6): 306-10.
- SANCHEZ-Pernaute** O, Esparza-Gordillo J, Largo R, Calvo E, Alvarez-Soria MA, Marcos ME, Herrero-Beaumont G y de Cordoba SR (2006). "Expression of the peptide C4b-binding protein beta in the arthritic joint." *Ann Rheum Dis* 65(10): 1279-85.
- SANCHEZ-Pernaute** O, Largo R, Calvo E, Alvarez-Soria MA, Egido J y Herrero-Beaumont G (2003a). "A fibrin based model for rheumatoid synovitis." *Ann Rheum Dis* 62(12): 1135-8.
- SANCHEZ-Pernaute** O, Lopez-Armada MJ, Calvo E, Diez-Ortego I, Largo R, Egido J y Herrero-Beaumont G (2003b). "Fibrin generated in the synovial fluid activates intimal cells from their apical surface: a sequential morphological study in antigen-induced arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 42(1): 19-25.
- SANCHEZ-Pernaute** O, Ospelt C, Neidhart M y Gay S (2008). "Epigenetic clues to rheumatoid arthritis." *J Autoimmun* 30(1-2): 12-20.
- SANCHEZ-Ramon** S, Lopez-Longo FJ y Carreno L (2010). "[Interleukins network in rheumatoid arthritis pathophysiology: beyond proinflammatory cytokines]." *Reumatol Clin* 6S3: S20-4.
- SANMARTÍ** Sala R (2007). "Remisión en la artritis reumatoide: ¿debe ser nuestro objetivo?" *Reumatol. Clin.* 3(1): 3.
- SARVESTANI** ST, Tate MD, Moffat JM, Jacobi AM, Behlke MA, Miller AR, Beckham SA, McCoy CE, Chen W, Mintern JD, O'Keefe M, John M, Williams BR y Gantier MP (2013). "Inosine-mediated modulation of RNA sensing by Toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR8." *J Virol* 88(2): 799-810.
- SATO** S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K y Akira S (2000). "Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways." *J Immunol* 165(12): 7096-101.
- SCHAEFER** L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Gotte M, Malle E, Schaefer RM y Grone HJ (2005). "The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages." *J Clin Invest* 115(8): 2223-33.
- SCHIEBNER** KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD y Horton MR (2006). "Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2." *J Immunol* 177(2): 1272-81.
- SCHER** JU y Pillinger MH (2009). "*The anti-inflammatory effects of prostaglandins.*" *J Investig Med* 57(6): 703-8.
- SCHLEGEL** PM, Steiert I, Kotter I y Muller CA (2013). "B cells contribute to heterogeneity of IL-17 producing cells in rheumatoid arthritis and healthy controls." *PLoS One* 8(12): e82580.
- SCHULZE-Koops** H, Lipsky PE, Kavanaugh AF y Davis LS (1996). "Persistent reduction in IL-6 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis after treatment with a monoclonal antibody to CD54 (ICAM-1)." *Clin Exp Immunol* 106(2): 190-6.
- SCOTT** DL, Wolfe F y Huizinga TW (2010). "Rheumatoid arthritis." *Lancet* 376(9746): 1094-108.
- SEBBAG** M, Moinard N, Auger I, Clavel C, Arnaud J, Nogueira L, Roudier J y Serre G (2006). "Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins." *Eur J Immunol* 36(8): 2250-63.
- SERRANO** Hernandez A (2009). "[Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis]." *Reumatol Clin* 5 Suppl 1: 1-5.
- SHAINOFF** JR, Stearns DJ, DiBello PM y Hishikawa-Itoh Y (1990). "Characterization of a mode of specific binding of fibrin monomer through its amino-terminal domain by macrophages and macrophage cell-lines." *Thromb Haemost* 63(2): 193-203.
- SHIOZAWA** S y Tokuhisa T (1992). "Contribution of synovial mesenchymal cells to the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Semin Arthritis Rheum* 21(4): 267-73.
- SIMSEK** I (2010). "TNF inhibitors - new and old agents for rheumatoid arthritis." *Bull NYU Hosp Jt Dis* 68(3): 204-10.
- SINGAL** DP, Li J y Zhu Y (1999). "Genetic basis for rheumatoid arthritis." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 47(5): 307-11.
- SINGH** JA, Arayssi T, Duray P y Schumacher HR (2004). "Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study." *Ann Rheum Dis* 63(7): 785-90.
- SILOUD** M (2006). "Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors." *Trends Mol Med* 12(4): 167-76.

SMILEY ST, King JA y Hancock WW (2001). "Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4." *J Immunol* 167(5): 2887-94.

SMILEY ST, King JA y Hancock WW (2001). "Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4." *J Immunol* 167(5): 2887-94.

SMITH MD (2010). "The normal synovium." *Open Rheumatol J* 5: 100-6.

SMITH MD, Barg E, Weedon H, Papangelis V, Smeets T, Tak PP, Kraan M, Coleman M y Ahern MJ (2003). "Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints." *Ann Rheum Dis* 62(4): 303-7.

SMITH WL (1989). "The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action." *Biochem J* 259(2): 315-24.

SOKOLOVE J, Johnson DS, Lahey LJ, Wagner CA, Cheng D, Thiele GM, Michaud K, Sayles H, Reimold AM, Caplan L, Cannon GW, Kerr G, Mikuls TR y Robinson WH (2014). "Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheumatol* 66(4): 813-21.

SONG JJ, Hwang I, Cho KH, Garcia MA, Kim AJ, Wang TH, Lindstrom TM, Lee AT, Nishimura T, Zhao L, Morser J, Nesheim M, Goodman SB, Lee DM, Bridges SL, Jr., Gregersen PK, Leung LL y Robinson WH (2011). "Plasma carboxypeptidase B downregulates inflammatory responses in autoimmune arthritis." *J Clin Invest* 121(9): 3517-27.

STANCZYK J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S y Kyburz D (2008). "Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 58(4): 1001-9.

STAPLES MP, March L, Lassere M, Reid C y Buchbinder R (2010). "Health-related quality of life and continuation rate on first-line anti-tumour necrosis factor therapy among rheumatoid arthritis patients from the Australian Rheumatology Association Database." *Rheumatology (Oxford)* 50(1): 166-75.

SUZUKI A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y y Yamamoto K (2003). "Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis." *Nat Genet* 34(4): 395-402.

SVARTZ N (1975). "The origin of rheumatoid arthritis." *Rheumatology* 6: 322-8.

SWAIN SL, Agrewala JN, Brown DM, Jelley-Gibbs DM, Golech S, Huston G, Jones SC, Kamperschroer C, Lee WH, McKinstry KK, Roman E, Strutt T y Weng NP (2006). "CD4+

T-cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4+ T cells in protective immunity to influenza." *Immunol Rev* 211: 8-22.

SWEENEY SE y Firestein GS (2004). "Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation." *Int J Biochem Cell Biol* 36(3): 372-8.

SZABA FM y Smiley ST (2002). "Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo." *Blood* 99(3): 1053-9.

TAKE Y, Nakata K, Hashimoto J, Tsuboi H, Nishimoto N, Ochi T y Yoshikawa H (2009). "Specifically modified osteopontin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes supports interaction with B cells and enhances production of interleukin-6." *Arthritis Rheum* 60(12): 3591-601.

TAKEUCHI O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K y Akira S (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* 11(4): 443-51.

TAKEUCHI O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K y Akira S (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." *Int Immunol* 13(7): 933-40.

TAKEUCHI O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL y Akira S (2002). "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins." *J Immunol* 169(1): 10-4.

TAKIZAWA Y, Suzuki A, Sawada T, Ohsaka M, Inoue T, Yamada R y Yamamoto K (2006). "Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids." *Ann Rheum Dis* 65(8): 1013-20.

TARCSA E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC y Steinert PM (1996). "Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin." *J Biol Chem* 271(48): 30709-16.

TARKOWSKI A, Bjersing J, Shestakov A y Bokarewa MI (2009). "Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4." *J Cell Mol Med* 14(6B): 1419-31.

TERMEER C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C y Simon JC (2002). "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." *J Exp Med* 195(1): 99-111.

TESAR BM, Jiang D, Liang J, Palmer SM, Noble PW y Goldstein DR (2006). "The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists." *Am J Transplant* 6(11): 2622-35.

THOMAS R y Lipsky PE (1996). "Presentation of self peptides by dendritic cells: possible implications for the

pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 39(2): 183-90.

TIAN J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA y Coyle AJ (2007). "Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE." *Nat Immunol* 8(5): 487-96.

TIWARI N, Chabra S, Mehdi S, Sweet P, Krasieva TB, Pool R, Andrews B y Peavy GM (2010). "Imaging of normal and pathologic joint synovium using nonlinear optical microscopy as a potential diagnostic tool." *J Biomed Opt* 15(5): 056001.

TOLBOOM TC, Pieterman E, van der Laan WH, Toes RE, Huidekoper AL, Nelissen RG, Breedveld FC y Huizinga TW (2002). "Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10." *Ann Rheum Dis* 61(11): 975-80.

TOO CL, Yahya A, Murad S, Dhaliwal JS, Larsson PT, Muhamad NA, Abdullah NA, Mustafa AN, Klareskog L, Alfredsson L, Padyukov L y Bengtsson C (2012). "Smoking interacts with HLA-DRB1 shared epitope in the development of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: results from the Malaysian Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (MyEIRA)." *Arthritis Res Ther* 14(2): R89.

TOUSSIROT E y Roudier J (2008). "Epstein-Barr virus in autoimmune diseases." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(5): 883-96.

TRAN CN, Davis MJ, Tesmer LA, Endres JL, Motyl CD, Smuda C, Somers EC, Chung KC, Urquhart AG, Lundy SK, Kovats S y Fox DA (2007). "Presentation of arthritogenic peptide to antigen-specific T cells by fibroblast-like synoviocytes." *Arthritis Rheum* 56(5): 1497-506.

TROUW LA, Haisma EM, Levarht EW, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Daha MR, Huizinga TW y Toes RE (2009). "Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways." *Arthritis Rheum* 60(7): 1923-31.

TUAN TL, Wu H, Huang EY, Chong SS, Laug W, Messadi D, Kelly P y Le A (2003). "Increased plasminogen activator inhibitor-1 in keloid fibroblasts may account for their elevated collagen accumulation in fibrin gel cultures." *Am J Pathol* 162(5): 1579-89.

TURUNEN S, Koivula MK, Melkko J, Alasaarela E, Lehenkari P y Risteli J (2013). "Different amounts of protein-bound citrulline and homocitrulline in foot joint tissues of a patient with anti-citrullinated protein antibody positive erosive rheumatoid arthritis." *J Transl Med* 11: 224.

US T, Cetin E, Kasifoglu N, Kasifoglu T y Akgun Y (2011). "[Investigation of Epstein-Barr virus and herpes simplex virus markers by serological and molecular methods in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus]." *Mikrobiyol Bul* 45(4): 677-83.

ÚSUGA X y Ossa AC (2012). "Autoinmunidad y receptores tipo Toll." *Iatreia* 25(3): 10.

VABULAS RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H y Wagner H (2001). "Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells." *J Biol Chem* 276(33): 31332-9.

VABULAS RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD y Wagner H (2002). "HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway." *J Biol Chem* 277(17): 15107-12.

VABULAS RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, Kirschning CJ, Da Costa C, Rammensee HG, Wagner H y Schild H (2002). "The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway." *J Biol Chem* 277(23): 20847-53.

VAN BEERS JJ, Rajmakers R, Alexander LE, Stammen-Vogelzangs J, Lokate AM, Heck AJ, Schasfoort RB y Pruijn GJ (2010). "Mapping of citrullinated fibrinogen B-cell epitopes in rheumatoid arthritis by imaging surface plasmon resonance." *Arthritis Res Ther* 12(6): R219.

VAN BEERS JJ, Willemze A, Stammen-Vogelzangs J, Drijfhout JW, Toes RE y Pruijn GJ (2012). "Anti-citrullinated fibronectin antibodies in rheumatoid arthritis are associated with human leukocyte antigen-DRB1 shared epitope alleles." *Arthritis Res Ther* 14(1): R35.

VAN GAALLEN F, Ioan-Facsinay A, Huizinga TW y Toes RE (2005). "The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis." *J Immunol* 175(9): 5575-80.

VAN NESS K, Chobaz-Peclat V, Castellucci M, So A y Busso N (2002). "Plasminogen activator inhibitor type-1 deficiency attenuates murine antigen-induced arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 41(2): 136-41.

VAN VENROOIJ WJ y Pruijn GJ (2008). "An important step towards completing the rheumatoid arthritis cycle." *Arthritis Res Ther* 10(5): 117.

VANEGAS H y Schaible HG (2001). "Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord." *Prog Neurobiol* 64(4): 327-63.

VARISCO PA, Peclat V, van Ness K, Bischof-Delaloye A, So A y Busso N (2000). "Effect of thrombin inhibition on synovial inflammation in antigen induced arthritis." *Ann Rheum Dis* 59(10): 781-7.

- VASSILIADIS E**, Oliveira CP, Alvares-da-Silva MR, Zhang C, Carrilho FJ, Stefano JT, Rabelo F, Pereira L, Kappel CR, Henriksen K, Veidal SS, Vainer B, Duffin KL, Christiansen C, Leeming DJ y Karsdal M (2012). "Circulating levels of citrullinated and MMP-degraded vimentin (VICM) in liver fibrosis related pathology." *Am J Transl Res* 4(4): 403-14.
- VIGLIANTI GA**, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ y Marshak-Rothstein A (2003). "Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA." *Immunity* 19(6): 837-47.
- VOGL T**, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C y Roth J (2007). "Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock." *Nat Med* 13(9): 1042-9.
- VOSSENAAR ER**, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB, van Venrooij WJ y Joosten LA (2003). "Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 48(9): 2489-500.
- WANG Y**, Li P, Wang S, Hu J, Chen XA, Wu J, Fisher M, Oshaben K, Zhao N, Gu Y, Wang D y Chen G (2012). "Anticancer peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitors regulate the autophagy flux and the mammalian target of rapamycin complex 1 activity." *J Biol Chem* 287(31): 25941-53.
- WANG YC**, Zhou Y, Fang H, Lin S, Wang PF, Xiong RP, Chen J, Xiong XY, Lv FL, Liang QL y Yang QW (2014). "Toll-like receptor 2/4 heterodimer mediates inflammatory injury in intracerebral hemorrhage." *Ann Neurol* 75(6): 876-89.
- WARD JR**, Dower SK, Whyte MK, Buttle DJ y Sabroe I (2006). "Potentiation of TLR4 signalling by plasmin activity." *Biochem Biophys Res Commun* 341(2): 299-303.
- WEINBERG JB**, Pippen AM y Greenberg CS (1991). "Extravascular fibrin formation and dissolution in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 34(8): 996-1005.
- WHEELER DS**, Chase MA, Senft AP, Poynter SE, Wong HR y Page K (2009). "Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4." *Respir Res* 10: 31.
- WHITAKER JW**, Shoemaker R, Boyle DL, Hillman J, Anderson D, Wang W y Firestein GS (2013). "An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype." *Genome Med* 5(4): 40.
- WILKINSON LS**, Pitsillides AA y Edwards JC (1993). "Giant cells in arthritic synovium." *Ann Rheum Dis* 52(3): 182-4.
- WILLEMZE A**, van der Woude D, Ghiddey W, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Verduyn W, de Vries RR, Houwing-Duistermaat JJ, Huizinga TW, Trouw LA y Toes RE (2012). "The interaction between HLA shared epitope alleles and smoking and its contribution to autoimmunity against several citrullinated antigens." *Arthritis Rheum* 63(7): 1823-32.
- WILLIS VC**, Gizinski AM, Banda NK, Causey CP, Knuckley B, Cordova KN, Luo Y, Levitt B, Glogowska M, Chandra P, Kulik L, Robinson WH, Arend WP, Thompson PR y Holers VM (2011). "N-alpha-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis." *J Immunol* 186(7): 4396-404.
- WOOD DD**, Ackerley CA, Brand B, Zhang L, Rajmakers R, Mastronardi FG y Moscarello MA (2008). "Myelin localization of peptidylarginine deiminases 2 and 4: comparison of PAD2 and PAD4 activities." *Lab Invest* 88(4): 354-64.
- XIA Q**, Bai QR, Dong M, Sun X, Zhang H, Cui J, Xi H, Hu XL, Shen Q y Chen L (2015). "Interaction Between Gastric Carcinoma Cells and Neural Cells Promotes Perineural Invasion by a Pathway Involving VCAM1." *Dig Dis Sci* 60(11): 3283-92.
- XU D**, Yan S, Wang H, Gu B, Sun K, Yang X, Sun B y Wang X (2015). "IL-29 Enhances LPS/TLR4-Mediated Inflammation in Rheumatoid Arthritis." *Cell Physiol Biochem* 37(1): 27-34.
- XU L**, Feng X, Tan W, Gu W, Guo D, Zhang M y Wang F (2013). "IL-29 enhances Toll-like receptor-mediated IL-6 and IL-8 production by the synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients." *Arthritis Res Ther* 15(5): R170.
- XU Q**, Chen X, Fu B, Ye Y, Yu L, Wang J, Li W y Cheng Q (1999). "Integrin alphavbeta3-RGDS interaction mediates fibrin-induced morphological changes of glomerular endothelial cells." *Kidney Int* 56(4): 1413-22.
- YAKOVLEV S**, Mikhailenko I, Tsurupa G, Belkin AM y Medved L (2014). "Polymerisation of fibrin alphaC-domains promotes endothelial cell migration and proliferation." *Thromb Haemost* 112(6): 1244-51.
- YAMADA M**, Ichikawa T, Ii M, Sunamoto M, Itoh K, Tamura N y Kitazaki T (2005). "Discovery of novel and potent small-molecule inhibitors of NO and cytokine production as antiseptic agents: synthesis and biological activity of alkyl 6-(N-substituted sulfamoyl)cyclohex-1-ene-1-carboxylate." *J Med Chem* 48(23): 7457-67.
- YAMAMOTO K** (2013). "[Genetic analyses of rheumatoid arthritis]." *Nihon Rinsho* 71(7): 1155-9.
- YAMANISHI Y**, Boyle DL, Green DR, Keystone EC, Connor A, Zollman S y Firestein GS (2005). "p53 tumor suppressor gene mutations in fibroblast-like synoviocytes from erosion synovium and non-erosion synovium in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 7(1): R12-8.
- YAN SF**, Zou YS, Gao Y, Zhai C, Mackman N, Lee SL, Milbrandt J, Pinsky D, Kisiel W y Stern D (1998). "Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism

of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 8298-303.

YANG YH, Carmeliet P y Hamilton JA (2001). "Tissue-type plasminogen activator deficiency exacerbates arthritis." *J Immunol* 167(2): 1047-52.

YASUDA T (2007). "Hyaluronan inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages through down-regulation of NF-kappaB via ICAM-1." *Inflamm Res* 56(6): 246-53.

ZHANG P, Cox CJ, Alvarez KM y Cunningham MW (2009). "Cutting edge: cardiac myosin activates innate immune responses through TLRs." *J Immunol* 183(1): 27-31.

ZHANG P, Ozdemir T, Chung CY, Robertson GP y Dong C (2010). "Sequential binding of alphaVbeta3 and ICAM-1 determines fibrin-mediated melanoma capture and stable adhesion to CD11b/CD18 on neutrophils." *J Immunol* 186(1): 242-54.

ZHONG B, Tien P y Shu HB (2006). "Innate immune responses: crosstalk of signaling and regulation of gene transcription." *Virology* 352(1): 14-21.

ZHOU M, Qin S, Chu Y, Wang F, Chen L y Lu Y (2014). "Immunolocalization of MMP-2 and MMP-9 in human rheumatoid synovium." *Int J Clin Exp Pathol* 7(6): 3048-56.

ANEXO 1

ANEXO 1

A1.1. Relación de secuencias modificadas por el efecto de la fibrina en RASF

A continuación se muestran dos tablas con la relación de secuencias sobreexpresadas (tabla A1.1) e inhibidas (tabla A.1.2) en 2 cultivos primarios de 10⁶ FSAR deprivadas de suero durante 48 h e incubadas o no con 0.8 mg/ml de fibrina polimerizada *in situ*, tras aislamiento y retrotranscripción de ARNm, según se explica en los apartados 4.1 y 4.2 de la sección material y métodos.

El ADNc resultante se hibridó en un *microarray* de genoma completo (whole-genome Affymetrix GeneChipplate). Los resultados fueron cribados excluyendo los genes no expresados en las células no estimuladas, así como aquellos cuya expresión no difiriera al menos en dos veces respecto a la expresión en células no estimuladas.

Una vez cribados los resultados, los diferentes genes se clasificaron en clústeres funcionales supervisados mediante el programa DAVID <https://david.ncifcrf.gov> (Huang da W, et al., 2009 [w/](#)), los grupos resultantes fueron posteriormente integrados en tres grandes grupos: moléculas con acción proinflamatoria (última celda de las tablas de color rojo), proinvasiva (color amarillo) y reguladora (color azul). La correcta ubicación de cada una de estas moléculas en los diferentes grupos se confirmó en diferentes bases de datos bioinformáticas, incluyendo las del centro nacional estadounidense de información biotecnológica (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <https://www.wikigenes.org/> (Hoffmann R, 2008 [w/](#)), <http://thebiogrid.org/> (Breitkreutz BJ, et al., 2003 [w/](#)), <http://www.omim.org/> (McKusick VA, 1998), <http://www.genecards.org/> (Rebhan M, et al., 1997 [w/](#)), <http://www.uniprot.org/> (UniProt C, 2008 [w/](#)), <http://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizome/>, <http://atlasgeneticsoncology.org/> (Huret JL, et al., 2003 [w/](#)). Los genes que no consiguieron ser asignados a ninguno de estos tres grupos aparecen al final de cada una de las tablas sin color.

A1.2. TABLA DE GENES SOBREEXPRESADOS

AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)		AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)	
202859_x_at	interleukin 8	16,1		230499_at	baculoviral IAP repeat-containing 3	2,201	
211506_s_at	interleukin 8	15,69		1570511_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like	2,197	
204470_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	8,251		220338_at	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	2,18	
209774_x_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	7,252		1555411_a_at	cyclin L1	2,167	
210538_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 3	5,138		205205_at	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	2,158	
205207_at	interleukin 6 (interferon, beta 2)	5,075		204286_s_at	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	2,14	
223218_s_at	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	5,043		220046_s_at	cyclin L1	2,14	
205619_s_at	mesenchyme homeobox 1	4,674		243026_x_at	X-linked inhibitor of apoptosis	2,133	
216598_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 2	4,59		219255_x_at	interleukin 17 receptor B	2,125	
223217_s_at	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	4,341		235756_at	sterile alpha motif domain containing 4A	2,122	
204224_s_at	GTP cyclohydrolase 1	4,188		209928_s_at	musculin (activated B-cell factor-1)	2,1	
218810_at	zinc finger CCHH-type containing 12A	4,147		244803_at	death associated protein 3	2,07	
241435_at	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	3,567		215221_at	forkhead box P1	2,066	
206706_at	neurotrophin 3	3,421		227458_at	CD274 molecule	2,065	
204748_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	3,321		203952_at	activating transcription factor 6	2,046	
222186_at	zinc finger, AN1-type domain 6	3,261		210362_x_at	promyelocytic leukemia; similar to promyelocytic leukemia protein isoform 1	2,036	
236907_at	poly(A) binding protein, cytoplasmic pseudogene 5; poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	3,081		201531_at	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	2,032	
201939_at	polo-like kinase 2 (Drosophila)	2,974		227884_at	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa	2,009	
243296_at	nicotinamide phosphoribosyltransferase	2,908		230791_at	nuclear factor I/B	2,008	
228153_at	ring finger protein 144B	2,688		203499_at	EPH receptor A2	2	
206375_s_at	heat shock 27kDa protein 3	2,667		227404_s_at	early growth response 1	10,65	
202638_s_at	intercellular adhesion molecule 1	2,617		1568765_at	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	8,264	
224156_x_at	interleukin 17 receptor B	2,61		201694_s_at	early growth response 1	5,39	
235419_at	ERBB receptor feedback inhibitor 1	2,57		202643_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	4,927	
237953_at	dipeptidyl-peptidase 4	2,564		202627_s_at	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	3,612	
235652_at	sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)	2,559		202644_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3,504	
225557_at	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	2,544		204337_at	regulator of G-protein signaling 4	3,419	
222040_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 3; similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene 2; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene	2,543		202628_s_at	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	3,246	
202637_s_at	intercellular adhesion molecule 1	2,535		204338_s_at	regulator of G-protein signaling 4	3,013	
205266_at	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	2,519		201502_s_at	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	2,992	
236524_at	TM2 domain containing 1	2,473		1559583_at	CD276 molecule	2,766	
204285_s_at	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	2,457		207345_at	folliculin	2,65	
202509_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	2,447		218469_at	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	2,525	
1555827_at	cyclin L1	2,394		207510_at	bradykinin receptor B1	2,507	
209706_at	NK3 homeobox 1	2,368		215078_at	superoxide dismutase 2, mitochondrial	2,34	
238883_at	mediator complex subunit 13-like	2,342		236000_s_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)	2,305	
1569142_at	tripartite motif-containing 13	2,285		202393_s_at	Kruppel-like factor 10	2,294	
207535_s_at	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	2,277		215253_s_at	regulator of calcineurin 1	2,201	
223501_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	2,271		201631_s_at	immediate early response 3	2,164	
203895_at	phospholipase C, beta 4	2,262		203823_at	regulator of G-protein signaling 3	2,107	
236128_at	zinc finger protein 91	2,249		203888_at	thrombomodulin	2,071	
224361_s_at	interleukin 17 receptor B	2,245		226847_at	folliculin	2,041	
238725_at	interferon regulatory factor 1	2,225		215888_at	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B (S. cerevisiae)	2,037	
				203213_at	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	2,033	

AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)	
218468_s_at	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	2,018	
204948_s_at	follistatin	2,006	
218995_s_at	endothelin 1	4,956	
235834_at	caldesmon 1	4,261	
222802_at	endothelin 1	3,961	
210764_s_at	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	3,714	
204363_at	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	3,68	
212974_at	DENN/MADD domain containing 3	3,319	
241769_at	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	3,149	
212975_at	DENN/MADD domain containing 3	2,784	
202149_at	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	2,737	
209959_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	2,727	
201289_at	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	2,633	
222108_at	adhesion molecule with Ig-like domain 2	2,631	
201109_s_at	thrombospondin 1	2,553	
203036_s_at	metastasis suppressor 1	2,476	
236251_at	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	2,475	
205659_at	histone deacetylase 9	2,46	
1554473_at	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	2,384	
203868_s_at	vascular cell adhesion molecule 1	2,375	
208460_at	gap junction protein, gamma 1, 45kDa	2,34	
209212_s_at	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	2,292	
240655_at	hypothetical protein LOC100133690; activated	2,261	
216180_s_at	leukocyte cell adhesion molecule synaptotagmin 2	2,209	
235705_at	triple functional domain (PTPRF interacting)	2,201	
204858_s_at	thymidine phosphorylase (endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived))	2,199	
211241_at	annexin A2 pseudogene 3; annexin A2; annexin A2 pseudogene 1	2,188	
239251_at	reticulon 4	2,147	
204420_at	FOS-like antigen 1	2,109	
1553129_at	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	2,077	
208240_s_at	fibroblast growth factor 1 (acidic)	2,071	
236561_at	transforming growth factor, beta receptor 1	2,067	
233109_at	collagen, type XII, alpha 1	2,065	
1555938_x_at	vimentin	2,064	
244753_at	actinin, alpha 4	2,064	
243012_at	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1	2,032	
211094_s_at	neurofibromin 1	2,03	
213176_s_at	latent transforming growth factor beta binding protein 4	2,008	
1558783_at	Wilms tumor 1 associated protein	5,378	
240809_at	chromosome 21 open reading frame 121	4,426	
1560659_at	hypothetical protein LOC150759	3,782	
219290_x_at	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	3,749	
209672_s_at	missing oocyte, meiosis regulator, homolog (Drosophila)	3,075	
242671_at	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	2,956	
225323_at	coiled-coil and C2 domain containing 1B	2,952	
242853_at	hypothetical protein LOC401106	2,93	

AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)	
242396_at	similar to hCG1774772	2,862	
223541_at	hyaluronan synthase 3	2,764	
211445_x_at	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide pseudogene 1	2,703	
241928_at	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)	2,688	
219131_at	UbiA prenyltransferase domain containing 1	2,672	
235985_at	phosphatidylinositol transfer protein, beta	2,627	
232573_at	F-box protein 32	2,611	
202052_s_at	retinoic acid induced 14	2,609	
215069_at	N-myristoyltransferase 2	2,552	
229437_at	microRNA host gene 2 (non-protein coding); microRNA 155	2,552	
1564129_a_at	quinolinate phosphoribosyltransferase	2,507	
230503_at		2,494	
215203_at	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	2,487	
233164_x_at	rhomboid domain containing 1	2,473	
226047_at	murine retrovirus integration site 1 homolog	2,459	
222214_at	suppressor of zeste 12 homolog pseudogene	2,456	
240717_at	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5; small nuclear ribonucleoprotein 35kDa (U11/U12)	2,42	
233002_at	protein phosphatase 4, regulatory subunit 4	2,406	
230099_at	SH3-domain GRB2-like pseudogene 2	2,387	
210598_at	KIAA0232	2,386	
235674_at	KIAA0922	2,38	
235512_at	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)	2,379	
209288_s_at	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	2,378	
234880_x_at	keratin associated protein 1-4; keratin associated protein 1-3	2,378	
240165_at		2,362	
236417_at	mitofusin 1	2,344	
233533_at	keratin associated protein 1-5	2,342	
227232_at	Enah/Vasp-like	2,327	
227929_at		2,308	
203951_at	calponin 1, basic, smooth muscle	2,306	
204699_s_at	chromosome 1 open reading frame 107	2,304	
223644_s_at	crystallin, gamma S	2,3	
242052_at	bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	2,3	
210432_s_at	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	2,296	
230886_at		2,289	
241497_at		2,287	
214272_at	cylindromatosis (turban tumor syndrome)	2,283	
244801_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7	2,256	
213672_at	methionyl-tRNA synthetase	2,249	
238299_at	chromosome 12 open reading frame 62	2,233	
230154_at	WW domain containing adaptor with coiled-coil	2,226	
232309_at	hypothetical protein LOC202181	2,224	
235190_at		2,221	
239331_at		2,218	
231513_at	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	2,215	
237842_at	MAP7 domain containing 3	2,21	
1558515_at		2,201	
235870_at	hypothetical LOC339524	2,194	
203766_s_at	leiomodulin 1 (smooth muscle)	2,193	
235438_at		2,187	

AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)	
236038_at		2,183	
242828_at	fidgetin	2,177	
1555978_s_at	hypothetical LOC727918	2,176	
229272_at	formin binding protein 4	2,171	
1566144_at	hypothetical LOC401131	2,156	
212570_at	endonuclease domain containing 1	2,156	
236700_at	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C	2,156	
205103_at	chromosome 1 open reading frame 61	2,153	
214805_at	similar to eukaryotic translation initiation factor 4A; small nucleolar RNA, H/ACA box 67; eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	2,153	
225685_at	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	2,141	
231053_at		2,141	
215747_s_at	regulator of chromosome condensation 1; SNHG3-RCC1 readthrough transcript	2,137	
242188_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	2,135	
236809_at	family with sequence similarity 133, member B pseudogene; similar to FAM133B protein; family with sequence similarity 133, member B	2,132	
238751_at	sorbin and SH3 domain containing 2	2,131	
238501_at		2,125	
238448_at	mitochondrial ribosomal protein L19	2,12	
242390_at	WD repeat and FYVE domain containing 1	2,118	
237460_x_at	chromosome 14 open reading frame 182	2,115	
214441_at	syntaxin 6	2,114	
226448_at	family with sequence similarity 89, member A	2,109	
237310_at	exostoses (multiple) 1	2,109	
223450_s_at	component of oligomeric golgi complex 3	2,104	

AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)	
212962_at	synapse defective 1, Rho GTPase, homolog 1 (C. elegans)	2,101	
228542_at	MRS2 magnesium homeostasis factor homolog (S. cerevisiae)	2,087	
232216_at	YME1-like 1 (S. cerevisiae)	2,085	
207464_at	adenosylhomocysteinase-like 1	2,081	
233219_at	muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs	2,074	
202081_at	immediate early response 2	2,062	
209286_at	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	2,058	
1563471_at	KIAA1632	2,05	
231199_at	N-acetyltransferase 13 (GCN5-related)	2,05	
238619_at		2,05	
1560141_at	hypothetical protein LOC100133039	2,045	
212817_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5	2,045	
242645_at	mitochondrial carrier homolog 2 (C. elegans)	2,044	
215641_at	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)	2,04	
229833_at	ENSG00000215067	2,04	
244165_at	chromosome 10 open reading frame 18	2,035	
220712_at	chromosome 8 open reading frame 60	2,033	
207492_at	N-glycanase 1	2,029	
230733_at		2,029	
1552622_s_at	ENSG00000168255	2,024	
244219_at	Wilms tumor 1 associated protein	2,012	

Tabla A1.1. Genes sobreexpresados por acción de la fibrina. En la primera columna aparece la identificación de la sonda del *chip array*, en la segunda el nombre del gen asociado a dicha secuencia, los genes que aparecen expresados por más de una secuencia se encuentran con color de fuente granate, finalmente aparecen los cambios de expresión respecto a no tratado y por último la casilla de asignación de grupo, donde el color rojo corresponde al grupo de genes con actividad proinflamatoria, el azul al grupo con actividad reguladora y el amarillo a actividad proinvasiva, los genes sin asignación no sufrieron modificación de color.

A1.3. TABLA DE GENES INHIBIDOS

AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)	AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)
209612_s_at	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide; alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide; alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	0,5	236806_at	chemokine (C-C motif) receptor 7	0,446
229466_at	tripartite motif-containing 66	0,499	204569_at	intestinal cell (MAK-like) kinase	0,444
236551_at	zinc finger protein 311	0,498	226651_at	homer homolog 1 (Drosophila)	0,441
236664_at	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	0,497	228708_at	RAB27B, member RAS oncogene family	0,44
208199_s_at	zinc finger protein 161 homolog (mouse)	0,496	230643_at	wingless-type MMTV integration site family, member 9A	0,439
213716_s_at	secreted and transmembrane 1	0,489	234952_s_at	PHD and ring finger domains 1	0,438
213951_s_at	PSMC3 interacting protein	0,489	202191_s_at	growth arrest-specific 7	0,437
233307_x_at	microsomal glutathione S-transferase 3	0,486	243940_at	teashirt zinc finger homeobox 2	0,435
222760_at	zinc finger protein 703	0,484	238669_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	0,431
237121_at	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide, pseudogene 4; alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	0,484	209821_at	interleukin 33	0,427
205127_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	0,483	209346_s_at	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha	0,418
231960_at	bromodomain and WD repeat domain containing 1	0,483	219622_at	RAB20, member RAS oncogene family	0,414
238813_at	aminolevulinate, delta-, synthase 2	0,483	207253_s_at	ubiquitin 1	0,413
224910_at	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	0,478	210194_at	phospholipase A2 receptor 1, 180kDa	0,412
209038_s_at	EH-domain containing 1	0,474	204633_s_at	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	0,411
244128_x_at	GLIS family zinc finger 1	0,471	204205_at	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G	0,407
213425_at	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	0,469	226452_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	0,407
203115_at	ferrochelatase (protoporphyrin)	0,463	232231_at	runt-related transcription factor 2	0,406
211658_at	peroxiredoxin 2	0,463	1560853_x_at	zinc finger protein 826	0,397
221234_s_at	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	0,463	213087_s_at	eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)	0,396
203180_at	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	0,462	214761_at	zinc finger protein 423	0,396
211610_at	Kruppel-like factor 6	0,462	210663_s_at	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	0,39
231227_at	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	0,462	209297_at	intersectin 1 (SH3 domain protein)	0,385
222912_at	arrestin, beta 1	0,461	209051_s_at	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	0,379
203386_at	TBC1 domain family, member 4	0,459	217388_s_at	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	0,378
214290_s_at	histone cluster 2, H2aa3; histone cluster 2, H2aa4	0,458	202114_at	sorting nexin 2	0,373
232780_s_at	zinc finger protein 691	0,458	203649_s_at	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	0,373
201827_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2	0,456	206461_x_at	metallothionein 1H	0,36
209782_s_at	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein	0,455	222749_at	suppressor of fused homolog (Drosophila)	0,342
219167_at	RAS-like, family 12	0,454	204835_at	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit	0,323
202247_s_at	metastasis associated 1	0,453	239959_x_at	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	0,311
205393_s_at	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	0,451	224964_s_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2	0,304
207017_at	RAB27B, member RAS oncogene family	0,451	204385_at	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	0,262
209613_s_at	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide; alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide; alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	0,451	203926_x_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	0,225
206911_at	tripartite motif-containing 25	0,45	229011_at	epithelial membrane protein 1	0,496
209724_s_at	zinc finger protein 161 homolog (mouse)	0,45	206645_s_at	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	0,471
211756_at	parathyroid hormone-like hormone	0,45	238363_at	catalase	0,463
			211741_x_at	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3	0,461
			218234_at	inhibitor of growth family, member 4	0,458
			205932_s_at	msh homeobox 1	0,455
			207180_s_at	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa	0,451
			221615_at	bone morphogenetic protein 8a	0,446

AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)	AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)
208433_s_at	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	0,44	238675_x_at	basic transcription factor 3-like 4; similar to hCG2008008	0,499
1555821_a_at	AKT1 substrate 1 (proline-rich)	0,434	203576_at	branched chain aminotransferase 2, mitochondrial	0,497
215506_s_at	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	0,427	219858_s_at	major facilitator superfamily domain containing 6	0,497
203665_at	heme oxygenase (decycling) 1	0,419	222309_at	chromosome 6 open reading frame 62	0,497
201418_s_at	SRY (sex determining region Y)-box 4	0,415	231467_at	maternally expressed 8 (non-protein coding)	0,497
213668_s_at	SRY (sex determining region Y)-box 4	0,393	239675_at	hypothetical protein LOC283143	0,497
223925_s_at	myotrophin; leucine zipper protein 6	0,39	215071_s_at	histone cluster 1, H2ac	0,496
204457_s_at	growth arrest-specific 1	0,376	218921_at	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	0,496
219837_s_at	cytokine-like 1	0,335	226657_at	chromosome 17 open reading frame 103	0,496
201010_s_at	thioredoxin interacting protein	0,253	224391_s_at	sialic acid acetyltransferase	0,495
201009_s_at	thioredoxin interacting protein	0,244	1554067_at	chromosome 12 open reading frame 66	0,494
201008_s_at	thioredoxin interacting protein	0,206	203662_s_at	tropomodulin 1	0,494
201416_at	SRY (sex determining region Y)-box 4	0,172	213116_at	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3	0,494
213493_at	sushi, nidogen and EGF-like domains 1	0,494	213300_at	ATG2 autophagy related 2 homolog A (S. cerevisiae)	0,494
228121_at	transforming growth factor, beta 2	0,493	228789_at	myotubularin related protein 6	0,494
201261_x_at	biglycan	0,492	1562848_at		0,493
204273_at	endothelin receptor type B	0,492	236634_at	chromosome 8 open reading frame 48	0,493
223693_s_at	Ras association and DIL domains	0,491	238438_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like	0,493
202997_s_at	lysyl oxidase-like 2	0,488	240824_at	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1	0,493
203019_x_at	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	0,488	1552777_a_at	retinoic acid early transcript 1E	0,492
231183_s_at	jagged 1 (Alagille syndrome)	0,482	222228_s_at	alkB, alkylation repair homolog 4 (E. coli)	0,492
218975_at	collagen, type V, alpha 3	0,475	230903_s_at	chromosome 8 open reading frame 42	0,491
202888_s_at	alanyl (membrane) aminopeptidase	0,474	1554712_a_at	glycine-N-acyltransferase-like 2	0,49
212099_at	ras homolog gene family, member B	0,47	1570070_at	chromosome 20 open reading frame 160	0,49
203018_s_at	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	0,469	220321_s_at	coiled-coil domain containing 121	0,49
239307_at	myosin, heavy chain 11, smooth muscle	0,466	242123_at	progesterin and adipoQ receptor family member VII	0,49
211173_at	cholecystokinin A receptor	0,453	1553743_at	family with sequence similarity 119, member A	0,489
210880_s_at	embryonal Fyn-associated substrate	0,443	227995_at		0,489
201945_at	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)	0,442	220943_s_at	chromosome 2 open reading frame 56	0,488
209098_s_at	jagged 1 (Alagille syndrome)	0,439	220242_x_at	zinc finger protein 701	0,487
209099_x_at	jagged 1 (Alagille syndrome)	0,437	242313_at	hypothetical LOC728730	0,487
213413_at	stonin 1; STON1-GTF2A1L readthrough transcript; general transcription factor IIA, 1-like	0,414	202755_s_at	glypican 1	0,486
211966_at	collagen, type IV, alpha 2	0,407	1563745_a_at	hypothetical LOC283050	0,485
210089_s_at	laminin, alpha 4	0,406	212484_at	family with sequence similarity 89, member B	0,485
219103_at	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 3	0,403	212552_at	hippocalcin-like 1	0,485
204249_s_at	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	0,379	221894_at	aarF domain containing kinase 2	0,485
209540_at	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	0,343	226079_at	FLYWCH family member 2	0,485
228706_s_at	claudin 23	0,32	226602_s_at	breakpoint cluster region pseudogene; breakpoint cluster region-like 4	0,485
211029_x_at	fibroblast growth factor 18	0,311	238822_at	mitochondrial ribosomal protein L3	0,485
211485_s_at	fibroblast growth factor 18	0,288	206100_at	carboxypeptidase M	0,484
205302_at	insulin-like growth factor binding protein 1	0,221	211742_s_at	ecotropic viral integration site 2B	0,484
1554012_at	R-spondin 2 homolog (Xenopus laevis)	0,177	230301_at	chromosome 7 open reading frame 46	0,484
202588_at	adenylate kinase 1	0,5	244455_at	potassium channel, subfamily T, member 2	0,484
44669_at	succinate dehydrogenase complex assembly factor 1	0,5	1555679_a_at	reticulin 4 interacting protein 1	0,483
1558626_at		0,499	213172_at	tetratricopeptide repeat domain 9	0,483
204282_s_at	phenylalanyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	0,499	1554614_a_at	polypyrimidine tract binding protein 2	0,482
			244012_x_at	exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	0,481

AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)	AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)
222711_s_at	rhomboid 5 homolog 1 (Drosophila)	0,48	238682_at	coiled-coil domain containing 96	0,461
237274_at		0,48	239896_at		0,461
238861_at	fatty acid desaturase 2	0,48	230927_at		0,459
1558882_at	similar to HIV TAT specific factor 1; cofactor required for Tat activation of HIV-1 transcription	0,479	49452_at	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	0,459
236361_at	UDP-N-acetyl-alpha-D- galactosamine:polypeptide N- acetylgalactosaminyltransferase-like 2	0,479	214692_s_at	jerky homolog (mouse)	0,458
214699_x_at	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	0,478	222297_x_at	ribosomal protein L18 pseudogene 11	0,458
235675_at	dihydrofolate reductase-like 1	0,478	231055_at		0,458
226423_at	progesterin and adipoQ receptor family member VIII	0,477	1556047_s_at	melanoma antigen family E, 1	0,457
49111_at		0,477	243118_at	chromosome 6 open reading frame 182	0,456
219453_at	kelch-like 36 (Drosophila)	0,476	206085_s_at	cystathionase (cystathionine gamma- lyase)	0,455
1552291_at	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class X	0,474	1569648_at	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 2 (Xenopus laevis)	0,453
203933_at	RAB11 family interacting protein 3 (class II)	0,474	226121_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 13	0,453
218350_s_at	geminin, DNA replication inhibitor	0,474	231116_at		0,453
224477_s_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16-like 1	0,474	223321_s_at	fibroblast growth factor receptor-like 1	0,452
200895_s_at	FK506 binding protein 4, 59kDa	0,473	203817_at	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	0,451
214549_x_at	small proline-rich protein 1A	0,473	226272_at	RCAN family member 3	0,451
230766_at		0,473	243013_at	mitochondrial ribosomal protein L19	0,451
236261_at	oxysterol binding protein-like 6	0,473	226430_at	RELT-like 1	0,45
239781_at	hCG1815504	0,472	227662_at	synaptopodin 2	0,45
228384_s_at	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 2	0,471	239942_at		0,45
228501_at	UDP-N-acetyl-alpha-D- galactosamine:polypeptide N- acetylgalactosaminyltransferase-like 2	0,471	227582_at	kelch domain containing 9	0,449
229620_at	selenoprotein P, plasma, 1	0,471	232131_at	similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2Q 2	0,449
229350_x_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	0,47	205640_at	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	0,448
209864_at	frequently rearranged in advanced T- cell lymphomas 2	0,469	222717_at	serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)	0,448
225784_s_at	zinc finger, C4H2 domain containing	0,469	229997_at	vang-like 1 (van gogh, Drosophila)	0,448
239989_at	centlein, centrosomal protein	0,469	205856_at	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	0,446
213832_at	potassium voltage-gated channel, Shal- related subfamily, member 3	0,467	224774_s_at	neuron navigator 1	0,445
220041_at	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Z	0,467	203608_at	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	0,444
237438_at	exosome component 1	0,467	236088_at	netrin G1	0,444
223742_at	mitochondrial ribosomal protein L4	0,466	243642_x_at		0,444
227438_at	alpha-kinase 1	0,466	235831_at		0,443
1552727_s_at	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17	0,465	243023_at		0,443
242136_x_at	C-terminal binding protein 2 pseudogene	0,465	223194_s_at	solute carrier family 22, member 23	0,442
239262_at		0,463	216411_s_at	galactokinase 2	0,441
242818_x_at		0,463	238133_at	netrin G1	0,441
243843_at	NEDD4 binding protein 2-like 1	0,463	239711_at	adenosine deaminase-like	0,441
57588_at	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3	0,463	242835_s_at	hypothetical LOC728730	0,441
227412_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E	0,462	213989_x_at	SET domain containing 4	0,44
228739_at	cystin 1	0,462	226338_at	transmembrane protein 55A	0,44
1553228_at	coiled-coil domain containing 89	0,461	227226_at	melanocortin 2 receptor accessory protein 2	0,44
209900_s_at	solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	0,461	220465_at	hypothetical LOC80054	0,439
229459_at	family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A5	0,461	229906_at	armadillo repeat containing 7	0,439
232137_at	zinc finger protein 616	0,461	202249_s_at	WD repeat domain 42A	0,438
			219401_at	xylosyltransferase II	0,438
			222568_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1	0,438
			215977_x_at	glycerol kinase 3 pseudogene; glycerol kinase	0,436
			222936_s_at	PPPDE peptidase domain containing 1	0,436
			205081_at	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	0,435

AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)	AFFYMETRIX 3PRIME_IVT_ID	Nombre del gen	Expresión (veces no tratado)
1558529_s_at		0,434	218620_s_at	HemK methyltransferase family member 1	0,382
213348_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	0,434	207177_at	prostaglandin F receptor (FP)	0,38
224175_s_at	TRIM6-TRIM34 readthrough transcript; tripartite motif-containing 6; tripartite motif-containing 34	0,433	231765_at	zinc finger, FYVE domain containing 20	0,38
237591_at	non-protein coding RNA 173	0,431	244014_x_at	family with sequence similarity 92, member A2; family with sequence similarity 92, member A1	0,38
226263_at	small nuclear ribonucleoprotein 48kDa (U11/U12)	0,43	242404_at		0,377
235850_at	WD repeat domain 5B	0,43	210933_s_at	fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	0,376
239010_at	hypothetical LOC642477; hypothetical LOC400879	0,43	216336_x_at	metallothionein 1L (gene/pseudogene); metallothionein 1E; metallothionein 1 pseudogene 3; metallothionein 1J (pseudogene)	0,376
219527_at	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2	0,428	217691_x_at	solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	0,372
230076_at	PITPNM family member 3	0,428	1560661_x_at	hypothetical protein LOC150759	0,371
234233_s_at	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 2	0,428	235916_at	yippee-like 4 (Drosophila)	0,366
243403_x_at	carboxypeptidase M	0,428	238467_at		0,364
229798_s_at		0,426	237083_at		0,356
223119_s_at	ubiquitin specific peptidase 47	0,424	229518_at	family with sequence similarity 46, member B	0,343
228713_s_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	0,424	231161_x_at	tripartite motif-containing 8	0,34
208322_s_at	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	0,423	219686_at	serine/threonine kinase 32B	0,337
32062_at	leucine rich repeat containing 14	0,423	229004_at	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 15	0,336
233402_at		0,422	202835_at	thioredoxin-like 4A	0,335
89476_r_at	aminopeptidase-like 1	0,421	206994_at	cystatin S	0,335
228353_x_at	ubiquitin associated and SH3 domain containing, B	0,42	214717_at	hypothetical protein DKFZp434H1419	0,329
244616_x_at	carboxypeptidase M	0,42	1560620_at	potassium channel, subfamily K, member 15	0,326
217165_x_at	metallothionein 1F	0,419	224966_s_at	dihydrouridine synthase 3-like (S. cerevisiae)	0,3
221261_x_at	melanoma antigen family D, 4B; melanoma antigen family D, 4	0,418	213183_s_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	0,298
227834_at	taxilin beta	0,418	219230_at	transmembrane protein 100	0,292
208161_s_at	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	0,415	221552_at	abhydrolase domain containing 6	0,285
244743_x_at	zinc finger protein 138	0,415	227782_at	zinc finger and BTB domain containing 7C	0,278
243671_at		0,414	1559141_s_at	similar to hCG1735895; family with sequence similarity 87, member B; family with sequence similarity 87, member A	0,245
202175_at	chondroitin polymerizing factor	0,412	Tabla A1.2. Genes inhibidos por acción de la fibrina. En la primera columna aparece la identificación de la sonda del <i>chip array</i> , en la segunda el nombre del gen asociado a dicha secuencia, los genes que aparecen expresados por más de una secuencia se encuentran con color de fuente granate, finalmente aparecen los cambios de expresión respecto a no tratado y por último la casilla de asignación de grupo, donde el color rojo corresponde al grupo de genes con actividad proinflamatoria, el azul al grupo con actividad reguladora y el amarillo a actividad proinvasiva, los genes sin asignación no sufrieron modificación de color.		
220178_at	chromosome 19 open reading frame 28	0,41			
209202_s_at	exostoses (multiple)-like 3	0,406			
227106_at	ENSG00000222024; ENSG00000182796	0,405			
236201_at		0,403			
219050_s_at	zinc finger, HIT type 2	0,401			
238429_at	transmembrane protein 71	0,398			
211829_s_at	G protein-coupled estrogen receptor 1	0,388			
220180_at	coiled-coil domain containing 68	0,387			
204040_at	ring finger protein 144A	0,384			

A1.4. BIBLIOGRAFÍA

BREITKREUTZ BJ, Stark C y Tyers M (2003). "*Osprey: a network visualization system.*" *Genome Biol* 4(3): R22.

HOFFMANN R (2008). "*A wiki for the life sciences where authorship matters.*" *Nat Genet* 40(9): 1047-51.

HUANGDA W, Sherman BT y Lempicki RA (2009). "*Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.*" *Nat Protoc* 4(1): 44-57.

HURET JL, Dessen P y Bernheim A (2003). "*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, year 2003.*" *Nucleic Acids Res* 31(1): 272-4.

MCKUSICK VA (1998). "*Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic*

Disorders." Baltimore, Johns Hopkins University Press.

NCBI *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine* 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

REBHAN M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J y Lancet D (1997). "*GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases.*" *Trends Genet* 13(4): 163.

UNIPROT C (2008). "*The universal protein resource (UniProt).*" *Nucleic Acids Res* 36(Database issue): D190-5.

ANEXO 2

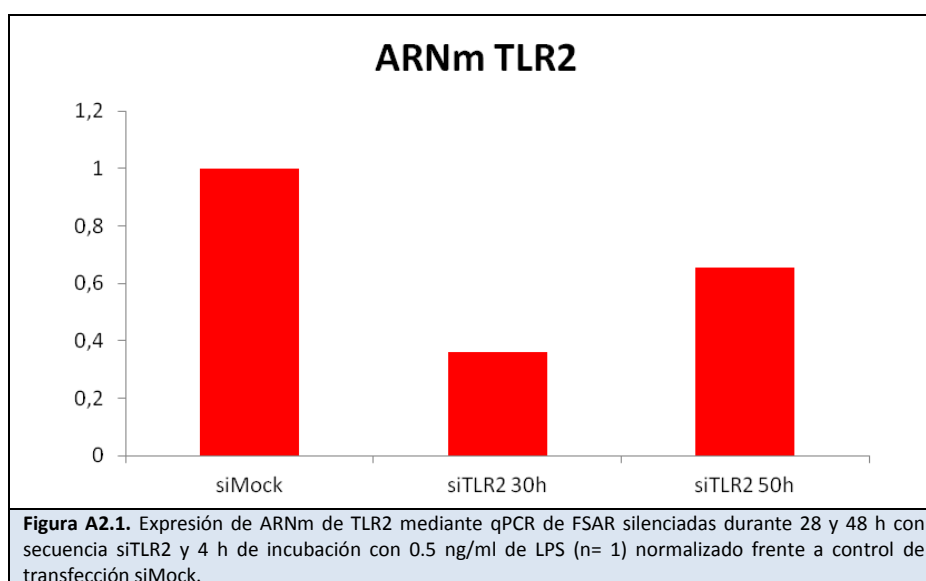
ANEXO 2

A2.1. Curva de tiempo de silenciamientos

Para estudiar el tiempo más efectivo que se adaptase a nuestros estudios de silenciamiento génico, se sembraron células tras silenciar los diferentes genes diana: TLR2, TLR4 e ICAM-I. Posteriormente se estimuló con 0.5 ng/ml de LPS y se recogieron las muestras en tiempo variable. Posteriormente se comprobó la efectividad de los diferentes silenciamientos mediante técnica de qPCR sobre las células silenciadas.

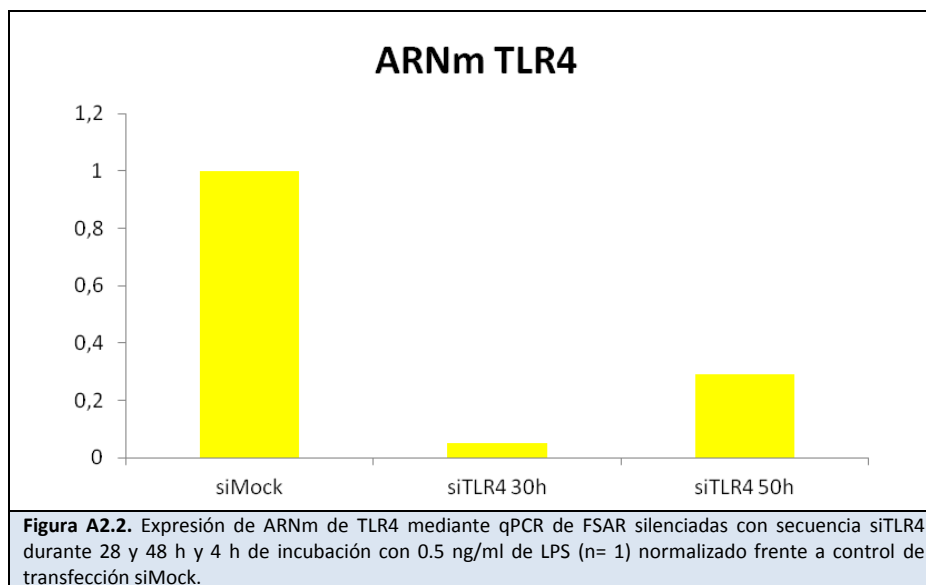
A2.1.1. Curva de tiempo de silenciamiento de TLR2

24 ó 44 h tras el silenciamiento siMock o siTLR2, y 4 h de estímulo con LPS (figura A2.1), se compararon los niveles de TLR2 a las 28 h y 48 h posttransfección, mediante qPCR, normalizando los datos en cada caso por el nivel de siMock correspondiente, tras lo cual se observó una inhibición del 64% y 34% respectivamente (n= 1).



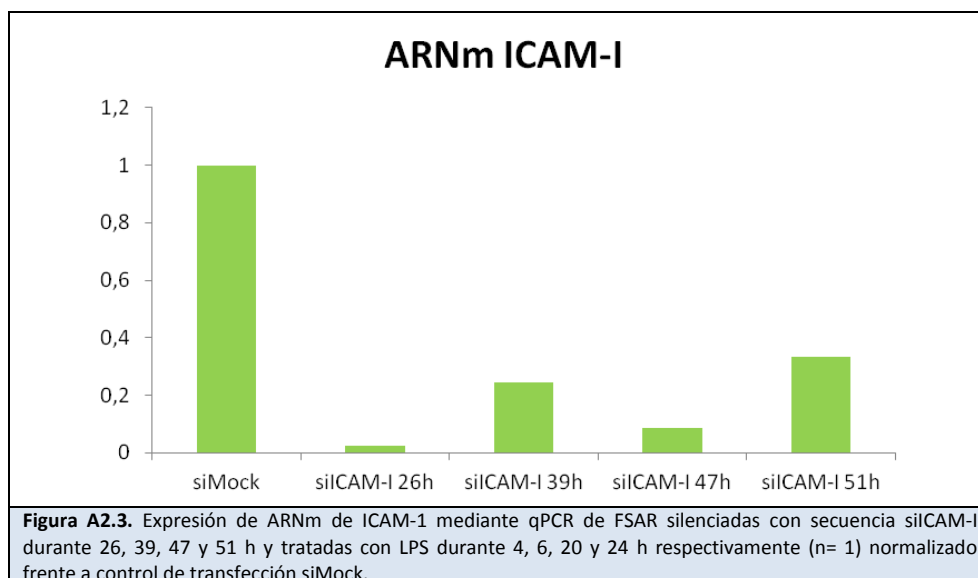
A2.1.2. Curva de tiempo de silenciamiento de TLR4

Al igual que en el caso de TLR2, tras el silenciamiento e incubación con LPS, se procesaron las muestras 28 y 48 h (figura A2.2). Tras analizar mediante qPCR los resultados se obtuvieron unas inhibiciones del 94.5% y un 71% respectivamente.



A2.1.3. Curva de tiempo de silenciamiento de ICAM-1

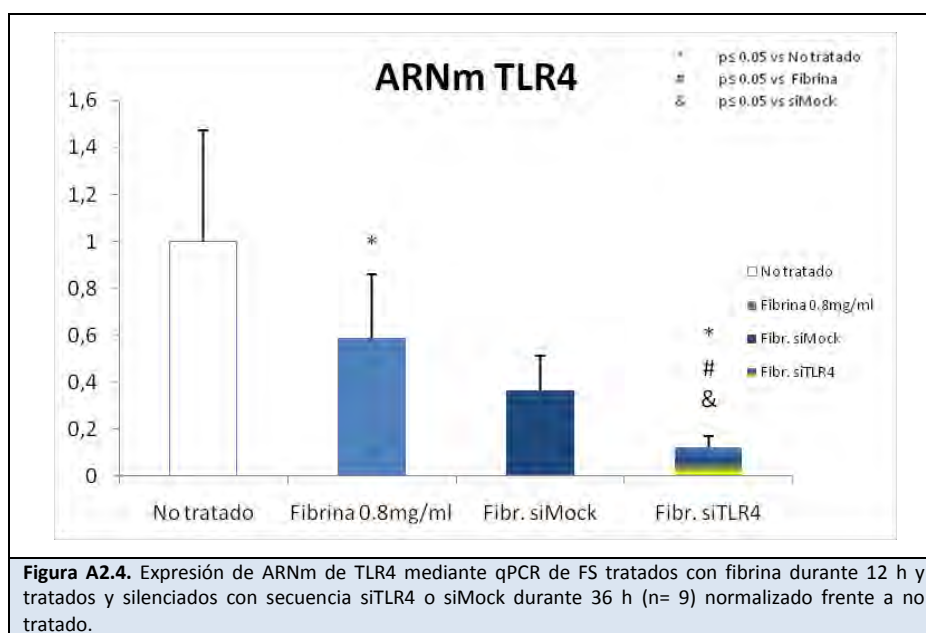
En el caso de ICAM-1 (figura A2.3), se transfectaron las células con secuencias siMock y siICAM-1 y se estimularon con LPS (0.5 ng/ml) a tiempos variables, tras normalizar frente a siMock, se obtuvieron inhibiciones del 97% tras 26 h de transfección y 4h de estímulo, 75% tras 33 h de transfección y 6 h de estímulo, 91% tras 47 h de transfección y 20 h de estímulo y del 66% tras 51 h de transfección y 24 h de estímulo.



A2.2. Eficiencia de los silenciamientos

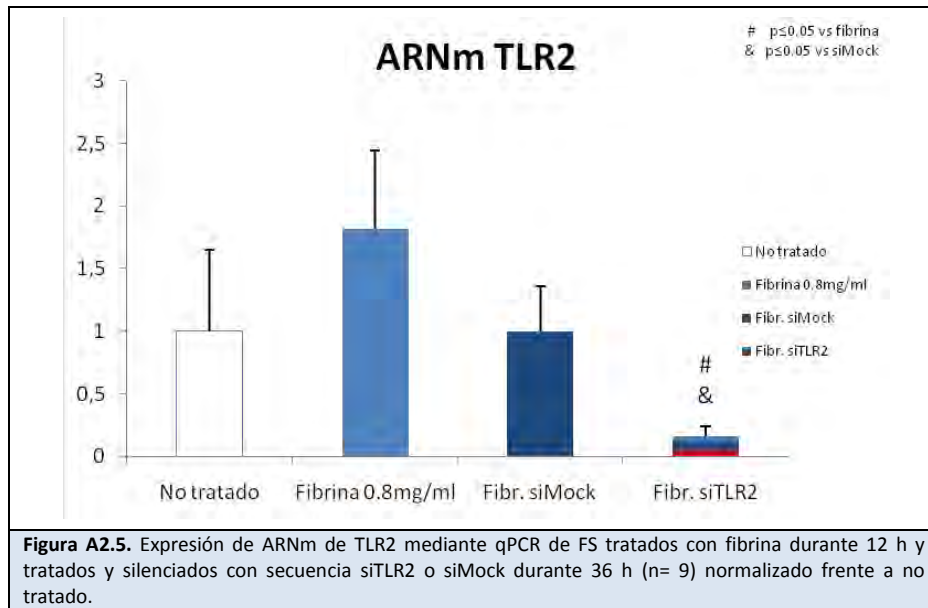
A2.2.1. Eficiencia del silenciamiento de TLR4

Tras 36 h de silenciamiento de FS frente a TLR4 ($n=9$) durante 36 h y 12 h de incubación con fibrina se compararon los niveles de expresión de TLR4 frente a células no tratadas, tratadas sin silenciar o tratadas y silenciadas con Mock siARN (figura A2.4). Tras lo que se obtuvieron unos niveles de expresión de un 33 y un 20% frente a siMock ($p < 0.05$) y fibrina ($p < 0.01$) respectivamente.



A2.2.2. Eficiencia del silenciamiento de TLR2

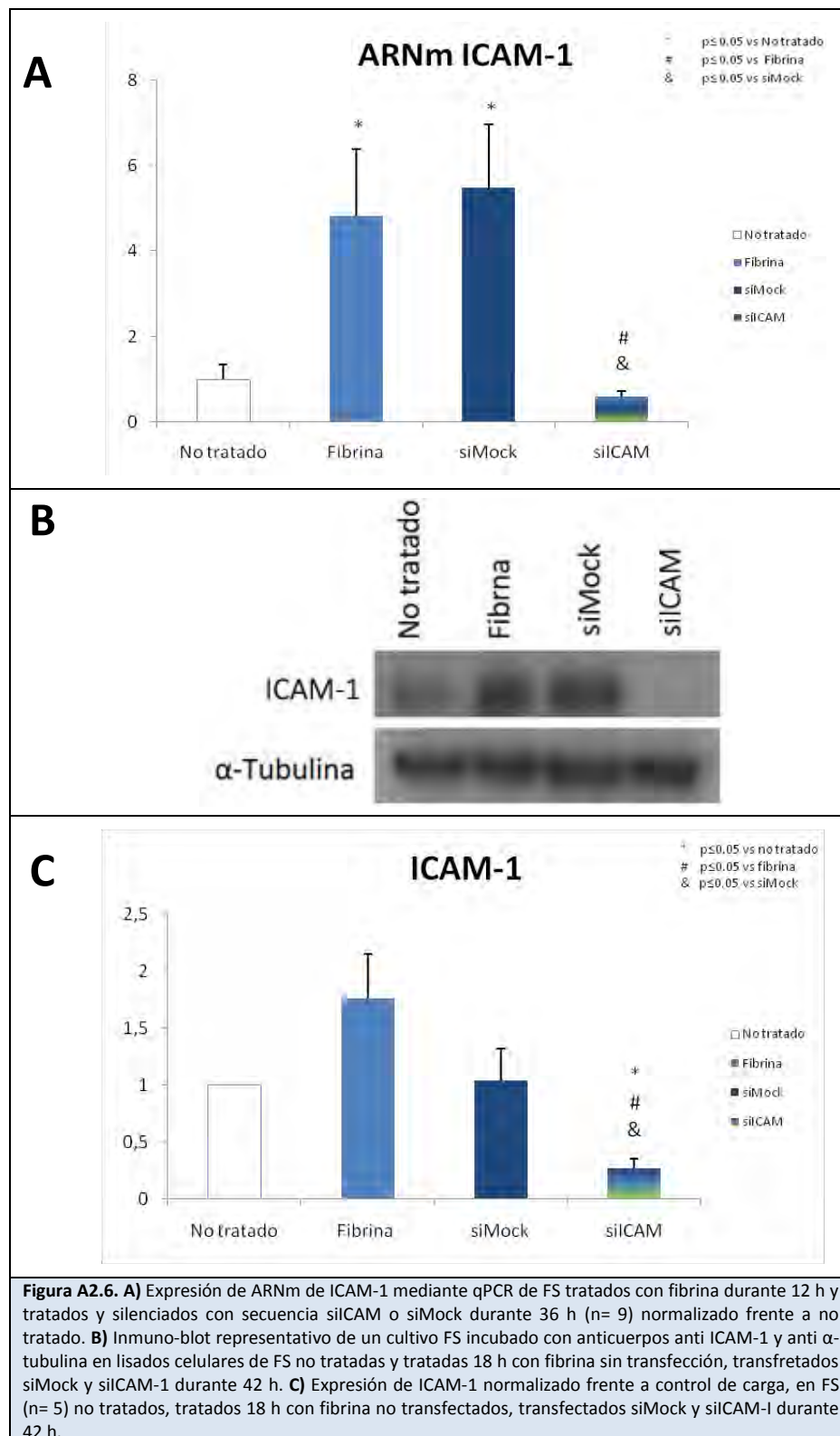
Tras silenciar TLR2 en FS ($n=9$) durante 36 h y tras 12 h de incubación con fibrina (figura A2.5), se inhibieron los niveles de ARNm de TLR2 con una expresión de un 16 y 9% los niveles frente a siMock ($p < 0.01$) y fibrina ($p < 0.01$) respectivamente.



A2.2.3. Eficiencia del silenciamiento de ICAM-1

Finalmente, tras silenciar ICAM-I en FS (n= 9) durante 36 h y tras 12 h de incubación con fibrina (figura A2.6.A), se obtuvieron unos niveles de expresión génicos del 10 y 12% frente a Fibrina ($p < 0.02$) y siMock ($p < 0.01$) respectivamente.

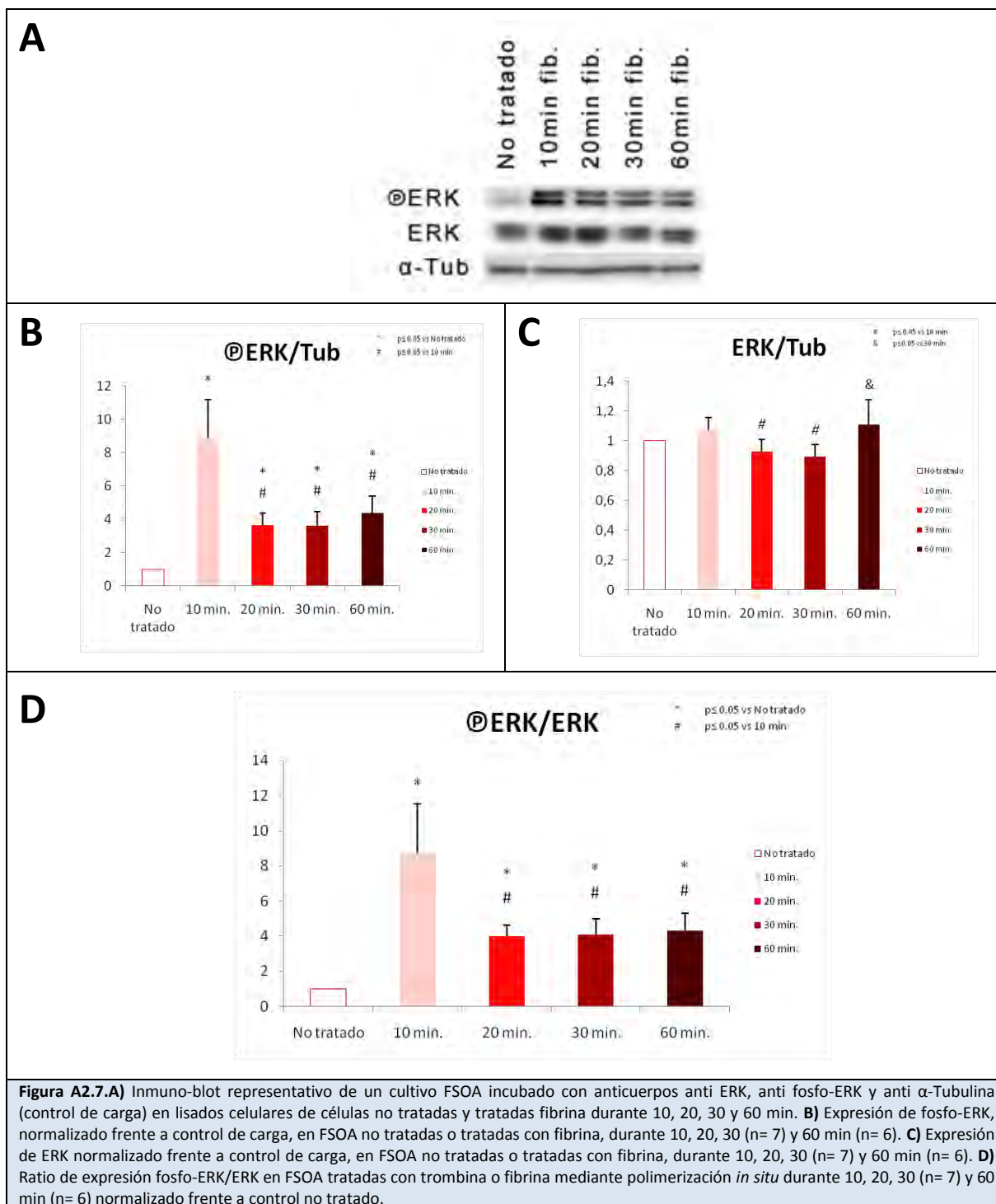
Por otro lado, a nivel proteico, tras 42 h de silenciamiento y 18 h de incubación con fibrina (n= 5), se confirmó el descenso en los niveles e ICAM-I mediante la técnica de Western Blot, obteniéndose unos niveles de un 27, 15 y 26% los niveles respecto a no tratado ($p < 0.05$), fibrina ($p < 0.05$) y siMock ($p < 0.05$) respectivamente (figura A2.6.B y C).



A2.3. Activación de la quinasa intracelular activada por mitógeno

A2.3.1. Activación de la quinasa intracelular activada por mitógeno ERK42/44 en FSOA

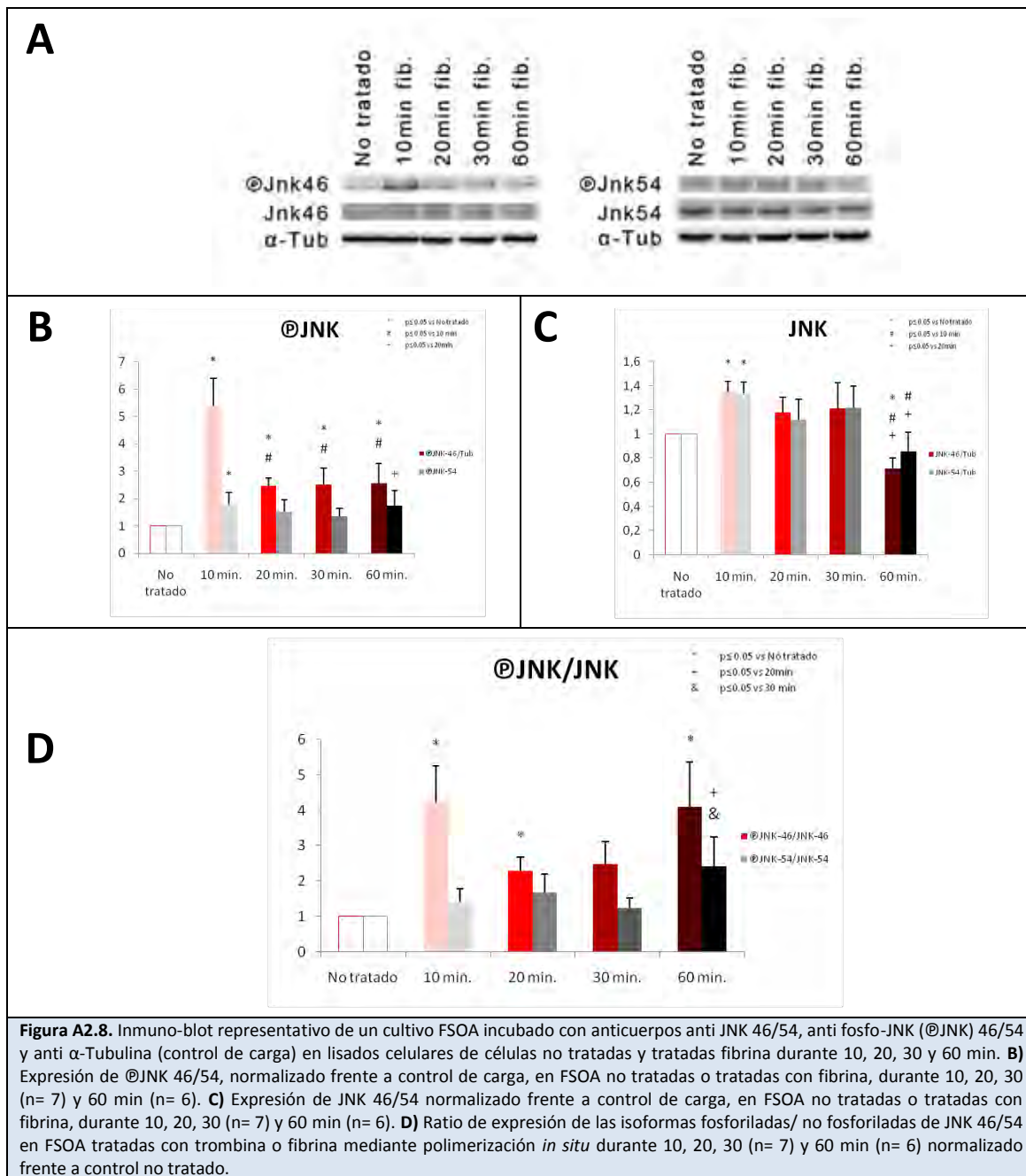
Al igual que sucedía en FSAR, la isoforma fosforilada de ERK, sufrió un pico de estimulación tras 10 min de incubación con fibrina, incremento que se mantuvo hasta el final del experimento aunque a unos niveles inferiores a los obtenidos a los 10 min. Este incremento se reflejó en el cociente de la isoforma fosforilada y no fosforilada, al presentar la no fosforilada únicamente variaciones interpretadas como fisiológicas.



A2.3.2. Activación de la quinasa intracelular activada por mitógeno JNK46/54 en FSOA

Respecto a JNK, el tratamiento con fibrina produjo un incremento en la fosforilación de la subunidad de 46 KDa similar al de ERK, que alcanzó un pico a los 10 min de incubación (figura A2.8) y se mantuvo hasta el final de experimento aunque

a unos niveles inferiores a los obtenidos a los 10 min, en el cociente de la isoforma fosforilada no fosforilada, pareció existir un repunte a los 60 min provocado por el descenso de los niveles de la isoforma no fosforilada. La isoforma de 56 KDa no pareció modificar sus niveles, tan solo se produjo un incremento a los 10 min de las dos isoformas simultáneamente, hecho que no se reflejó en el cociente.



ANEXO 3

EXTENDED REPORT

Citrullination enhances the pro-inflammatory response to fibrin in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

Olga Sanchez-Pernaute,^{1,2} Maria Filkova,¹ Antonio Gabucio,² Martin Klein,¹ Hanna Maciejewska-Rodrigues,¹ Caroline Ospelt,¹ Fabia Brentano,¹ Beat A Michel,¹ Renate E Gay,¹ Gabriel Herrero-Beaumont,² Steffen Gay,¹ Michel Neidhart,¹ Astrid Juengel¹

Handling editor Tore K Kvien

► Additional supplementary files are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201906>).

¹Center for Experimental Rheumatology, University Hospital Zurich and Zurich Center for Integrative Human Physiology (ZIHP), Zurich, Switzerland

²Rheumatology Division, Fundacion Jimenez Diaz, Autonoma University Madrid, Madrid, Spain

Correspondence to

Dr Olga Sanchez Pernaute, Rheumatology Division, Fundacion Jimenez Diaz University Hospital, Avda Reyes Catolicos 2; Madrid 28040, Spain; osanchez@fjd.es

Received 21 April 2012

Revised 5 November 2012

Accepted 18 November 2012

Published Online First

12 December 2012

ABSTRACT

Objective Fibrin deposits are characteristic of the synovial tissues in rheumatoid arthritis (RA). Once citrullinated, fibrin becomes an autoantigen and is thought to contribute in this way to perpetuate the disease. Our study aimed to analyse the responses of RA synovial fibroblasts (RASf) to native and citrullinated fibrin.

Methods The transcriptome induced by fibrin in RASf was approached with whole-genome-based gene expression arrays. The upregulation of selected pro-inflammatory genes by fibrin was confirmed in additional primary cell cultures using quantitative PCR and ELISA. Citrullination reactions were carried out with recombinant human peptidylarginine deiminases (PAD) 2 and 4.

Results In the whole-genome array native fibrin was found to modulate the gene expression profile of RASf, particularly upregulating mRNA levels of several pro-inflammatory cytokines. The induction of interleukin (IL)-6 and IL-8 by fibrin was confirmed in additional samples at both the mRNA and the protein level. Blocking and knockdown experiments showed the participation of toll-like receptor (TLR)4 in the induction of both cytokines. As compared with the native macromolecule, PAD2-citrullinated fibrin induced significantly higher expression of the pro-inflammatory cytokines in these cells.

Conclusions Our results suggest that fibrin mediates inflammatory responses in RASf via a TLR4 pathway. In this way, fibrin and particularly its citrullinated form may contribute to sustain the cytokine burst in RA.

activation is likely mediated by the induction of chemokines and interleukin (IL)-6.¹⁰ In macrophages, CD14 and of toll-like receptor (TLR)4 have been shown to participate in fibrinogen-induced responses.^{11 12} TLR are detectors of pathogen-associated molecular patterns, and trigger the production of cytokines.¹³ TLR4 is targeted by bacterial lipopolysaccharide (LPS), but also binds endogenous products, or 'damage'-associated molecular patterns (DAMPs), such as extracellular matrix fragments.¹⁴ Both TLR2 and TLR4 are overexpressed in RA, and it has been suggested that pathogen-associated molecular patterns and DAMPs contribute to perpetuate joint inflammation through their engagement.¹⁵ Additionally, TLR4 suppression attenuates experimental arthritis.^{16 17}

Fibrin is a major autoantigen of anticitrullinated peptide antibodies (ACPA) in RA.^{18 19} Citrullination consists of the substitution of arginine residues of proteins for citrulline by peptidylarginine deiminases (PAD). Citrullination of matrix proteins can be found in inflamed joints and is not restricted to RA.²⁰ In contrast, the development of ACPA, and also of antibodies to citrullinated fibrin (ACF), is highly specific of RA and identifies a distinct subset of patients.²¹ ACF are found in approximately two-thirds of the patients.^{22 23} In early arthritis subpopulations, both ACPA and ACF herald the progression to established RA, and predict a more severe course of the disease.^{22 24 25}

Along with its contribution to the autoimmune response, citrullination could also enhance fibrin-dependent cell activation.^{12 26}

We describe here the pro-inflammatory activity of fibrin in RASf via TLR4, and the stronger response elicited by its citrullinated form. Our results provide a connection between the intra-articular accumulation of fibrin, its modification by PAD and the innate inflammatory response of RA.

MATERIALS AND METHODS

A complete description of the experimental methods is given in the online supplementary text.

Experimental design

These studies were conducted in primary RASf cultures. Two methods of cell stimulation were

INTRODUCTION

The accumulation of fibrin in joints is characteristic of rheumatoid arthritis (RA). Intra-articular fibrin can be regarded as a marker of severe disease because it is found at invasive sites,¹ and has been shown to correlate with macrophage infiltration.² Additionally, its presence at early stages of the disease suggests its role in the pathogenesis of RA.^{3 4} We have previously proposed that fibrin deposits could account for a persistent activation of surrounding RA synovial fibroblasts (RASf), conferring them with aggressive features.^{5 6}

Fibrinogen, the soluble precursor of fibrin, promotes adhesiveness and migration of leucocytes through the binding of α/β integrins.⁷⁻⁹ The



Citrullination enhances the pro-inflammatory response to fibrin in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

Olga Sanchez-Pernaute, Maria Filkova, Antonio Gabucio, et al.

Ann Rheum Dis 2013 72: 1400-1406 originally published online December 12, 2012

doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201906

Updated information and services can be found at:

<http://ard.bmj.com/content/72/8/1400.full.html>

These include:

Data Supplement

"Supplementary Data"

<http://ard.bmj.com/content/suppl/2012/12/11/annrheumdis-2012-201906.DC1.html>

References

This article cites 49 articles, 21 of which can be accessed free at:

<http://ard.bmj.com/content/72/8/1400.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Connective tissue disease](#) (3178 articles)
[Degenerative joint disease](#) (3439 articles)
[Immunology \(including allergy\)](#) (3758 articles)
[Musculoskeletal syndromes](#) (3689 articles)
[Rheumatoid arthritis](#) (2407 articles)

Notes

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

MATERIALS AND METHODS

Patients and fibroblast cultures

Synovial samples were obtained during joint replacement surgery from patients with RA according to the American College of Rheumatology criteria. [1] Cells were isolated by disruption with 1.5 mg/ml dispase II (Roche, Reinach, Switzerland) for 1 h, at 37°C in agitation, and cultured in 10% fetal calf serum (FCS)-enriched Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies, Basel, Switzerland). Confluent cells were used between passages 4 and 6.

In situ fibrin polymerization

To study the effects elicited by native fibrin on RASF, cells were starved from serum for 48 h. Fibrinogen at 0.3 to 0.8 mg/ml (American Diagnostica inc., Stamford, CT) was mixed with 0.5% FCS-enriched DMEM on ice and 0.75 IU/ml thrombin (Sigma-Aldrich, Buch, Switzerland) was added. The mixture was immediately spread on top of cell monolayers, and plates were transferred to the incubator where fibrin clots were formed within 15 min.[2] Selection of dose was based on previous works focused on the study of cell-fibrin interactions in extravascular systems,[2-4] as well as on concentrations of fibrinogen reached in RA synovial effusions.[5]

Citrullination of fibrin and fibrinogen

In order to test the effect yielded by citrullinated fibrin as compared to the native macromolecule, fibrin was assembled in culture plates at 0.8 mg/ml in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ as described above. The clots were then incubated in 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM CaCl₂, 5 mM dithiothreitol (Fluka, Buch, Switzerland) with 12.5 to 18 µg/ml recombinant

human PAD2 (ModiQuest Research, Nijmegen, The Netherlands) or 15 to 41 µg/ml PAD4 (ModiQuest Research) for 2, 4, or 15 h, at 37°C. The citrullination reaction was stopped with 0.02 M ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), and the citrullinating reagents were removed by repeated washing with PBS. Synovial fibroblasts were seeded on top of the clots and incubated in 2% FCS-supplemented DMEM.

Fibrinogen was citrullinated using the same conditions as for fibrin. In all citrullination reactions, sham-treated controls were performed with native fibrin or fibrinogen in citrullinating solution without the enzymes.

Both in vitro stimulation systems are shown in supplementary Figure S1.

Fibrin homogenization for protein studies

Fibrin clots were dissolved in 10 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton-X 100, 0.1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride. The homogenized mixture was centrifuged at 15000 xg for 20 min at 4°C, and insoluble pellets were discarded. The same protocol was carried out in fibrinogen controls. To analyze the release of cytokines, fibrin homogenates and cell-culture supernatants were collected and stored at -20°C after centrifugation.

Assessment of the citrullination efficiency

Protein extracts were subjected to 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and stained with Coomassie blue (Sigma-Aldrich). In addition, resolved peptides were transferred to nitrocellulose membranes, fixed in 4% paraformaldehyde, and cross-linked using a commercial anti-citrulline (modified) detection kit (Millipore, Billerica, MA) as specified by the manufacturer. The membranes were blocked with 5%

non-fat dry milk and blotted with rabbit anti-citrulline (modified) antibodies at a 1:5000 dilution. Detection was done with peroxidase-labelled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, Magden, Switzerland) and enhanced chemoluminescence (GE Healthcare, Zürich, Switzerland).

Assessment of cell viability

Viability was assessed at 18 and 24 h, using a tetrazolium based colorimetric system (MTS, Sigma-Aldrich).[6] For these experiments we seeded 8×10^3 fibroblasts per well on top of gels as mentioned above. Five different cell cultures, tested in triplicates were used.

Controls performed to exclude lipopolysaccharide contamination

To rule out lipopolysaccharide (LPS) contamination, 3×10^4 cells starved from serum for 48 h (n=3) were incubated with 0.5% FCS-enriched DMEM with each of the following reagents: 0.75 IU/ml thrombin, in situ polymerized fibrin (with 0.8 mg/ml fibrinogen and 0.75 UI/ml thrombin), citrullination buffer (1:200 diluted), and 36 µg/ml PAD2, in the absence or presence of 2 µg/ml polymyxin B (Sigma-Aldrich). At this concentration, polymyxin B efficiently blocked IL-6 induction by 2 - 500 ng/ml LPS in RASF (data not shown). As an additional control, PAD2 was pre-heated for 3 min at 80°C before cell stimulation. At 15 h of incubation, supernatants were collected, centrifuged to remove cell debris, and employed to determine levels of IL-6 with ELISA. Fibrin clots were mixed with an equal volume of lysis buffer and homogenized as explained previously.

Primer pairs employed in qPCR studies

Amplification of target genes was conducted using cDNA as template and SYBR green techniques with the following primer pairs: Interleukin (IL)-6

sense: 5'- CTCTTCAGAACGAATTGACAAACAA-3' and *antisense*: 5'-
 GAGATGCCGTCGAGGATGTAC-3'; IL-8 *sense*: 5'-
 TTGGCAGCCTTCCTGATTTC-3' and *antisense*: 5'-
 TGGCAAAACTGCACCTTCAC-3'; Toll-like receptor (TLR)4 *sense*: 5'-
 GAGCTGTACCGCCTTCTCAG -3' and *antisense*: 5'-
 CTGTCCTCCCACTCCAGGTA -3'; TLR2 *sense*: 5'-
 GGGTTGAAGCACTGGACAAT -3' and *antisense*: 5'-
 CTTCTTGAGAGGCTGATG -3'; Intracellular adhesion molecule (ICAM)-1
sense: 5'- CACCTATGGCAACGACTCCT -3' and *antisense*: 5'-
 TCACACTGACTGAGGCCTTG -3'. The house-keeping gene 18S was
 amplified with a commercial VIC-TAMRA primer probe (Applied Biosystems,
 Rotkreuz, Switzerland).

Small interference (siRNA) silencing experiments

Commercially available siRNA targeting TLR2, TLR4, ICAM-1, and scrambled siRNA control reagent were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and transduced at a concentration of 40 pmol/7 x 10⁵ RASF using the Basic Nucleofector[®] kit for primary mammalian fibroblasts and nucleofection program U23 from Amaxa (Lonza, Barcelona, Spain). Cells were stimulated with 0.8 mg/ml in situ polymerized fibrin 24 h after transduction with the specific siRNA; mRNA studies were conducted in cell lysates at 12 h, and peptide release at supernatants was measured at 18 h. The knockdown effect on gene expression yielded by siRNA transfections is shown in supplementary Figure S2.

Cell immunofluorescence

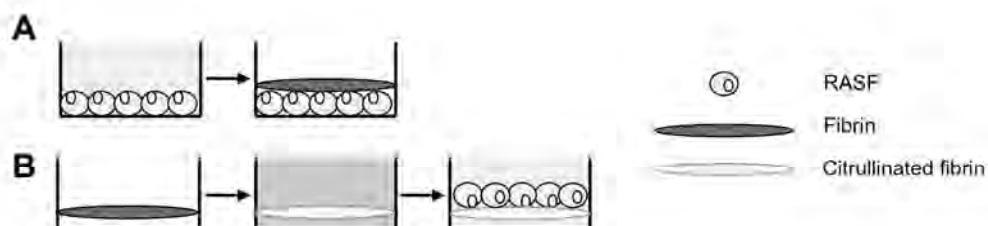
Cells were grown to confluence in 8-well chamber slides (Nunc, Barcelona, Spain), starved from serum for 48 hours and stimulated with 0.8 mg/ml fibrin. At end points, cells were fixed with 2% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% triton in PBS, and incubated with in the specific antibodies in 0.1% BSA-PBS, at 4°C, overnight. Primary antibodies employed were goat antibodies directed against human inhibitor of nuclear factor (NF) κ B I κ B α , rabbit anti human phosphorylated (ph) I κ B α , rabbit anti-human I κ B β , and rabbit anti-human p65 (all from Santa Cruz Biotechnology). Alexa 488-labeled anti-rabbit IgG antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA), and Cy5-labeled anti-goat IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch) were applied for 1 h, at 20°C in the dark. After washing, slides were mounted with Vectashield plus DAPI (Vector laboratories, Peterborough, UK).

Preparation of nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

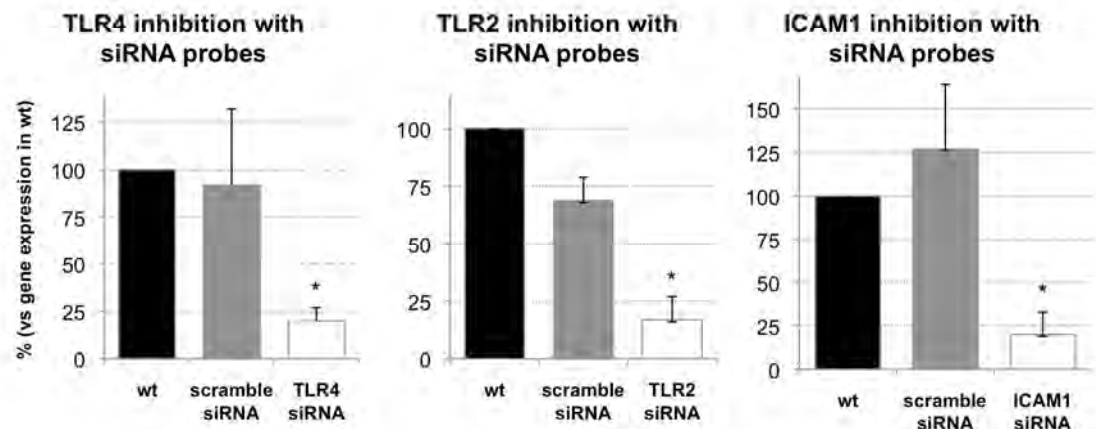
10⁶ cells per condition were used to assess NF κ B activation by electrophoretic mobility-shift assay (EMSA). To isolate nuclear extracts, cells were incubated with 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, and 0.2 mM PMSF with protease inhibitors, at 4°C, for 10 minutes, followed by a 20 minute incubation with 20 mM HEPES, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 0.2 mM PMSF, at 4°C. Binding reactions were prepared with 5 μ g nuclear extracts, plus binding buffer, 1 μ g Poly d(I-C), and 10 ng of labeled NF κ B-specific consensus probe (Panomics, Redwood City, CA). Specificity of the complexes was confirmed by adding cold probe to the reaction. Samples were loaded onto 6% acrylamide/bis gels, run at 120 V, 4°C, for 1 hour. Bound oligos were then transferred to a nylon

membrane and immobilized with 1 hour heating at 80°C. Development was carried out with a streptavidin-HRP conjugate, followed by incubation with substrate solution, provided by the manufacturer.

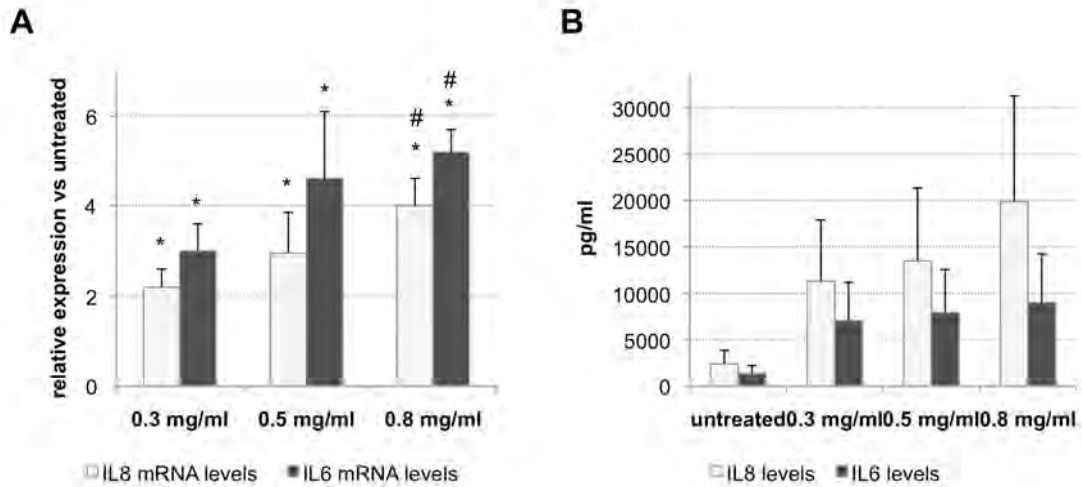
- [1] Arnett FC ES, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. . The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. . *Arthritis Rheum.* 1988;31:315-24.
- [2] Qi J, Goralnick S, Kreutzer DL. Fibrin regulation of interleukin-8 gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood.* 1997 Nov 1;90(9):3595-602.
- [3] Tuan TL, Wu H, Huang EY, Chong SS, Laug W, Messadi D, et al. Increased plasminogen activator inhibitor-1 in keloid fibroblasts may account for their elevated collagen accumulation in fibrin gel cultures. *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1579-89.
- [4] Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci.* 1997 Apr;110 (Pt 7):861-70.
- [5] Takizawa Y, Suzuki A, Sawada T, Ohsaka M, Inoue T, Yamada R, et al. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 2006 Aug;65(8):1013-20.
- [6] Kumi-Diaka J, Saddler-Shawnette S, Aller A, Brown J. Potential mechanism of phytochemical-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells: Therapeutic synergy in genistein and beta-lapachone combination treatment. *Cancer Cell Int.* 2004 Aug 17;4(1):5.



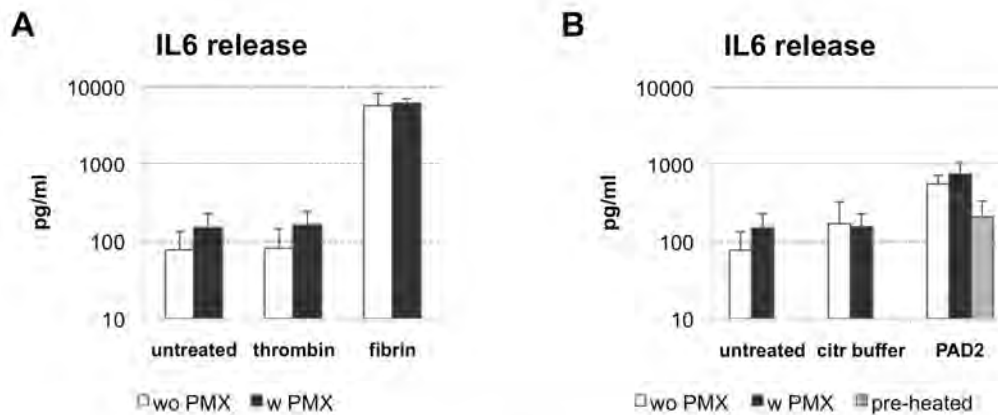
Supplementary Figure S1. Methods of cell stimulation with fibrin. (A) In situ fibrin polymerization. Cells were grown to confluence, and starved from serum. Fibrinogen and thrombin were mixed in 0.5% FBS-enriched DMEM and spread on top of cells, and the fibrin matrix was formed at 37°C. This approach was employed in all experiments, except those involving citrullination. (B) Cell stimulation by citrullinated or sham-treated fibrin. In these experiments, fibrin was clotted and incubated in citrullinating solution containing peptidylarginine deiminase (PAD)2, PAD4 or no enzyme. At the end of the incubation period, the reaction was stopped, and the citrullination reagents were removed. Cells were seeded on the clots in 2% FBS-enriched DMEM.



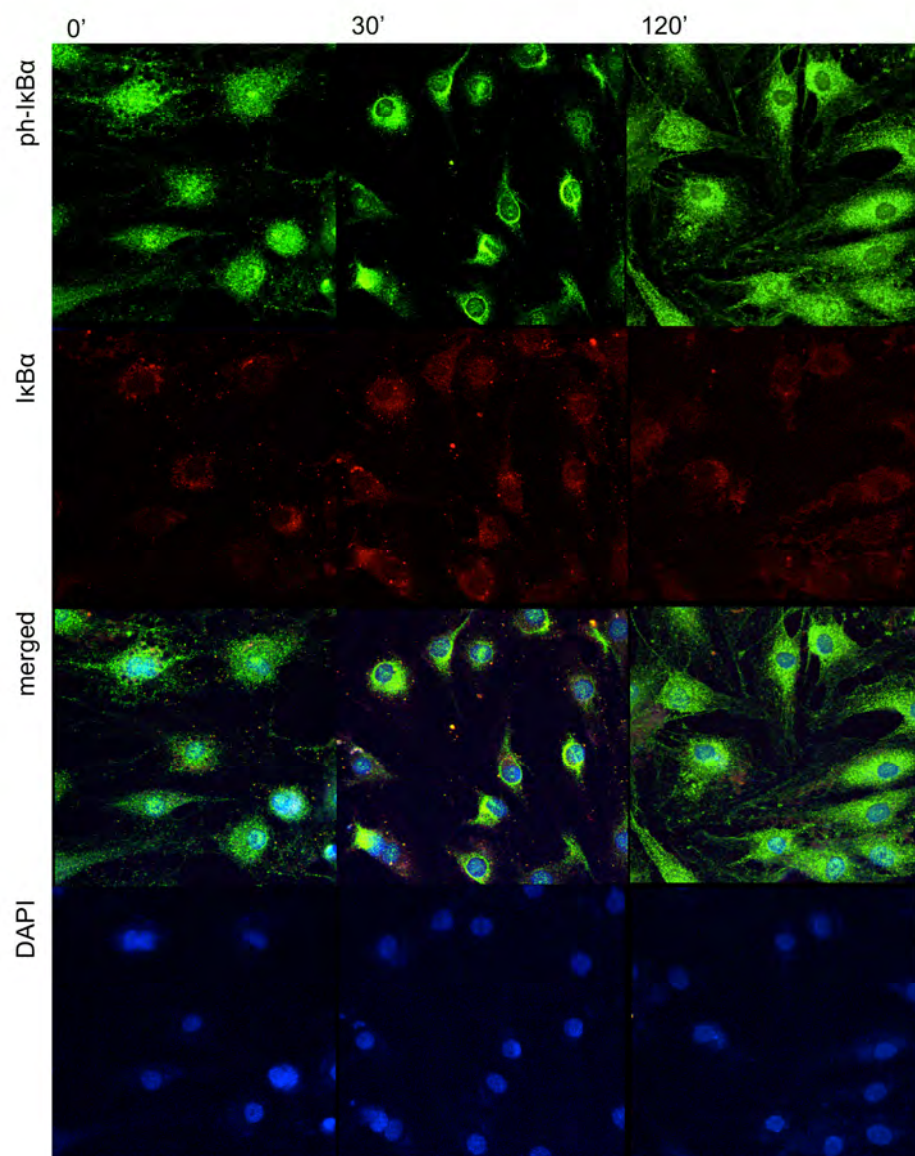
Supplementary Figure S2. Efficiency of the siRNA transduction was checked out with qPCR. In all cases, the gene expression of the target was significantly reduced as compared to wild type (black bars), and mock-transfected cells (grey bars). The inhibition of gene transcription approached 80%, * $p < 0.05$ vs mock and wt.



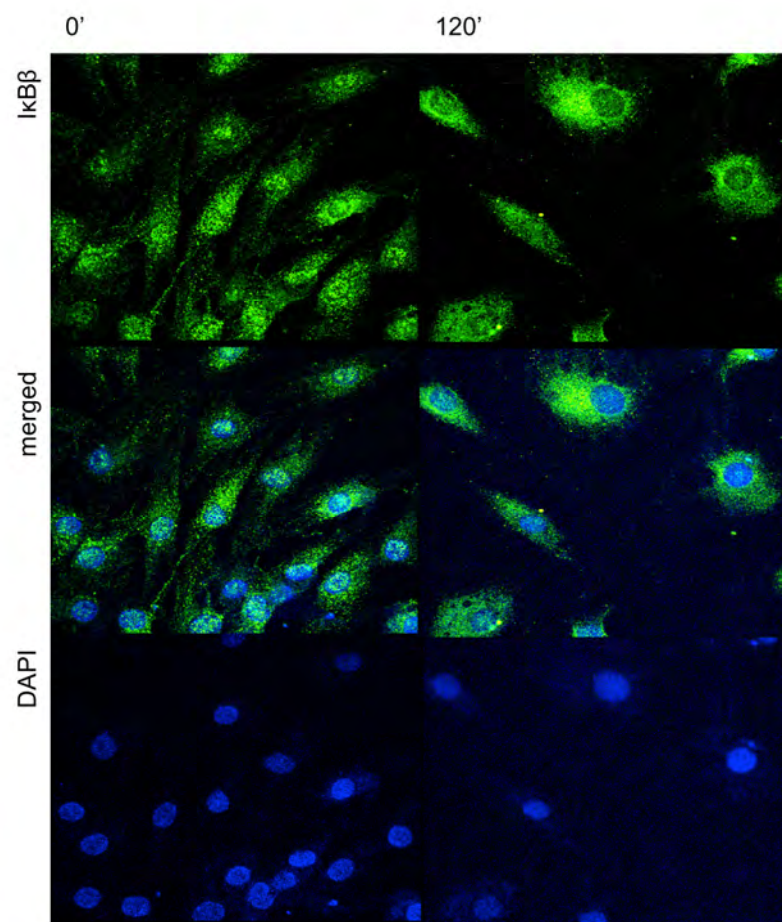
Supplementary Figure S3. (A) Gene expression of IL-8 and IL-6, as studied with qPCR, at 18 h of incubation with increasing concentrations of fibrin (n=5). As shown in the graph, at 0.3 mg/ml, fibrin induced a 2.2 (± 0.4) fold increase in IL-8 mRNA, and a 3.0 (± 0.6) fold increase in IL-6 mRNA compared to untreated cells; 0.5 mg/ml fibrin increased the transcripts in 3.0 (± 0.9) and 4.6 (± 1.5) respectively, and 0.8 mg/ml yielded a 4.0 (± 0.6) and a 5.2 (± 0.5) fold increase. *p<0.05 vs untreated cells; #p<0.05 vs 0.3 mg/ml fibrin (B) Levels of IL-8 and IL-6 in the supernatant fractions of cells incubated with increasing concentrations of fibrin for 24 h (n=3). Levels of IL8 were 11.3 (± 6.5) $\times 10^3$ pg/ml, 13.5 (± 7.8) $\times 10^3$ pg/ml, and 19.8 (± 11.4) $\times 10^3$ pg/ml in supernatants from cells incubated with 0.3, 0.5, and 0.8 mg/ml, respectively, while supernatants from untreated cells showed 2.5 (± 1.4) $\times 10^3$ pg/ml. In the same samples, IL6 levels were 7.1 (± 4.1) $\times 10^3$ pg/ml, 8.0 (± 4.6) $\times 10^3$ pg/ml, and 9.0 (± 5.2) $\times 10^3$ pg/ml, while supernatants from untreated cells had 1.5 (± 0.8) pg/ml.



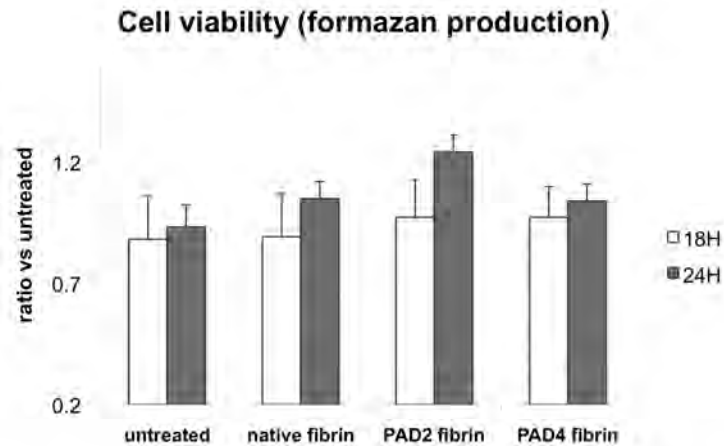
Supplementary Figure S4. Bacterial LPS is a ligand for TLR4, which in turn mediates pro-inflammatory responses elicited by LPS. Since the fibrin-dependent induction of cytokines was in our experiments attributable to this receptor of the innate system, we performed control experiments to rule out that LPS contamination of the reagents employed could be responsible for the effect drawn. (A) In the presence of 2 μ g/ml polymyxin B (PMX), an inhibitor of LPS, fibrin retained its induction capacity, as shown by levels of IL-6 measured in supernatants of cell cultures at 15 h of incubation ($n=3$). In the same way, levels of IL-6 drawn by thrombin + polymyxin B were 2.0-fold (± 1.7) higher than those of thrombin alone ($n=3$). (B) To exclude LPS contamination of citrullinating reagents, cells were incubated for 15 h with the citrullination solution or with PAD2 in the absence or presence of 2 μ g/ml PMX, and IL-6 levels were measured in supernatants. As an additional control, PAD2 was denatured by heating before addition to cells ($n=3$). As compared to PAD2 incubated cells, addition of PMX resulted in a 1.4-fold (± 0.4) increase in levels of IL-6 in supernatants ($n=3$). Further, when cells were cultured with heat-denatured PAD2, levels of IL-6 dropped to a 34% ($\pm 13\%$) of those shown with the active enzyme. Regarding addition of polymyxin B to the citrullination solution, levels of IL-6 reached 124% ($\pm 40\%$) of those yielded by the citrullination solution alone ($n=3$).



Supplementary Figure S5. Cell immunofluorescence shows the nuclear-to-cytoplasm migration of phosphorylated IκBα taking place upon stimulation with fibrin in RASF, in the same experiments shown in Figure 4A. In this way, p65 and phosphorylated IκBα shuttled in opposite direction, allowing activation of NFκB responsive elements. Non-phosphorylated IκBα stayed at the cytoplasm, and its signal faded at 2 h of fibrin addition, probably reflecting degradation of the inhibitory peptide.



Supplementary Figure S6. As observed with phosphorylated IκBα in the previous figure, we could show, with cell immunofluorescence, a shift in IκBβ subcellular localization upon fibrin stimulation. In resting cells, IκBβ was preferentially found in the cell nucleus, whereas it was clustered to the cytoplasm at 2 h after cell stimulation. Altogether, our results suggests that fibrin-induced signalling pathway targets IκBαβ nuclear-to-cytoplasm shuttle system, in this way habilitating p65 activation.



Supplementary Figure S7. Cell viability at 18 h and 24 h of incubation with peptidylarginine deiminase (PAD)2-citrullinated, PAD4-citrullinated or sham-treated fibrin (n=5). Our assay showed that viability of RASF was not impaired in our citrullinating conditions. At 18 h of incubation, the ratios of formazan production as regards an untreated sample taken as reference were 0.89 (±0.18), 0.97 (±0.16), 0.97 (±0.13), respectively for cells incubated with sham-treated native fibrin, PAD2, or PAD4 citrullinated fibrin, and 0.88 (±0.18) in untreated cells (n=5). Similarly, at 24 hours of incubation, ratios were 1.07 (±0.07), 1.23 (±0.07), 1.04 (±0.07), and 0.93 (±0.09), for each of the mentioned culture conditions, respectively (n=5). No significant differences were found between them.

Supplementary Table 1 Regulation of gene expression by fibrin in a synovial fibroblast primary culture from an RA patient, as determined with an Affymetrix whole genome chip array. Treated and untreated cells were simultaneously tested. Results are shown as fold-change in mRNA levels of fibrin-treated vs untreated cells. A bidirectional threshold of 2-fold was set to consider the effect significant. Low-expressed genes and genes not expressed in one of the conditions tested were filtered out to reduce noise.

<i>Gene Name</i>	<i>Fold Change</i>	<i>Description</i>
202859_x_at	16.1	interleukin 8
211506_s_at	15.69	interleukin 8
204470_at	8.251	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity alpha)
209774_x_at	7.252	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
201694_s_at	5.39	early growth response 1
210538_s_at	5.138	baculoviral IAP repeat-containing 3
205207_at	5.075	interleukin 6 (interferon beta 2)
218995_s_at	4.956	endothelin 1
202643_s_at	4.927	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
205619_s_at	4.674	mesenchyme homeo box 1
216598_s_at	4.59	chemokine (C-C motif) ligand 2
204224_s_at	4.188	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)
218810_at	4.147	zinc finger CCCH-type containing 12A
219290_x_at	3.749	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides
210764_s_at	3.714	cysteine-rich angiogenic inducer 61
204363_at	3.68	coagulation factor III (thromboplastin tissue factor)
202627_s_at	3.612	serpin peptidase inhibitor clade E (nexin plasminogen activator inhibitor type 1) member 1
202644_s_at	3.504	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
206706_at	3.421	neurotrophin 3
204337_at	3.419	regulator of G-protein signalling 4
204748_at	3.321	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
212974_at	3.319	DENN/MADD domain containing 3
222186_at	3.261	Zinc finger A20 domain containing 3
202628_s_at	3.246	serpin peptidase inhibitor clade E (nexin plasminogen activator inhibitor type 1) member 1
209672_s_at	3.075	hypothetical protein FLJ20323
204338_s_at	3.013	regulator of G-protein signalling 4
201502_s_at	2.992	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
201939_at	2.974	polo-like kinase 2 (Drosophila)
212975_at	2.784	DENN/MADD domain containing 3
202149_at	2.737	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 9
209959_at	2.727	nuclear receptor subfamily 4 group A member 3
211445_x_at	2.703	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide pseudogene 1 ; similar to alpha NAC/1.9.2. protein
219131_at	2.672	UbiA prenyltransferase domain containing 1

206375_s_at	2.667	heat shock 27kDa protein 3
207345_at	2.65	follistatin
201289_at	2.633	cysteine-rich angiogenic inducer 61
222108_at	2.631	adhesion molecule with Ig-like domain 2
202638_s_at	2.617	intercellular adhesion molecule 1 (CD54) human
202052_s_at	2.609	rhinovirus receptor
201109_s_at	2.553	retinoic acid induced 14
215069_at	2.552	thrombospondin 1
222040_at	2.543	N-myristoyltransferase 2
202637_s_at	2.535	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
218469_at	2.525	intercellular adhesion molecule 1 (CD54) human
205266_at	2.519	rhinovirus receptor
207510_at	2.507	gremlin 1 cysteine knot superfamily homolog
215203_at	2.487	(Xenopus laevis)
203036_s_at	2.476	leukemia inhibitory factor (cholinergic
205659_at	2.46	differentiation factor)
204285_s_at	2.457	bradykinin receptor B1
222214_at	2.456	golgi autoantigen golgin subfamily a4
202509_s_at	2.447	metastasis suppressor 1
209288_s_at	2.378	histone deacetylase 9
203868_s_at	2.375	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein
209706_at	2.368	1
215078_at	2.34	Similar to KIAA0160 gene product is novel
208460_at	2.34	tumor necrosis factor alpha-induced protein 2
203951_at	2.306	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
204699_s_at	2.304	vascular cell adhesion molecule 1
210432_s_at	2.296	NK3 transcription factor related locus 1
202393_s_at	2.294	(Drosophila)
209212_s_at	2.292	superoxide dismutase 2 mitochondrial
214272_at	2.283	gap junction protein alpha 7 45kDa (connexin
207535_s_at	2.277	45)
203895_at	2.262	calponin 1 basic smooth muscle
213672_at	2.249	chromosome 1 open reading frame 107
216180_s_at	2.209	sodium channel voltage-gated type III alpha
215253_s_at	2.201	Kruppel-like factor 10
204858_s_at	2.199	Kruppel-like factor 5 (intestinal)
203766_s_at	2.193	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)
211241_at	2.188	nuclear factor of kappa light polypeptide gene
220338_at	2.18	enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
201631_s_at	2.164	phospholipase C beta 4
205205_at	2.158	Methionine-tRNA synthetase
212570_at	2.156	synaptojanin 2
214805_at	2.153	Down syndrome critical region gene 1
205103_at	2.153	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
220046_s_at	2.14	leiomodulin 1 (smooth muscle)
		annexin A2 pseudogene 3
		Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2
		immediate early response 3
		v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
		B nuclear factor of kappa light polypeptide gene
		enhancer in B-cells 3 (avian)
		KIAA0830 protein
		Eukaryotic translation initiation factor 4A isoform
		1
		chromosome 1 open reading frame 61
		cyclin L1

204286_s_at	2.14	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
215747_s_at	2.137	regulator of chromosome condensation 1
219255_x_at	2.125	interleukin 17 receptor B
214441_at	2.114	syntaxin 6
204420_at	2.109	FOS-like antigen 1
203823_at	2.107	regulator of G-protein signalling 3
212962_at	2.101	synapse defective 1 Rho GTPase homolog 1 (C. elegans)
209928_s_at	2.1	musculin (activated B-cell factor-1)
207464_at	2.081	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1
208240_s_at	2.071	fibroblast growth factor 1 (acidic)
203888_at	2.071	thrombomodulin
215221_at	2.066	Forkhead box P1
202081_at	2.062	immediate early response 2
209286_at	2.058	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
203952_at	2.046	activating transcription factor 6
212817_at	2.045	DnaJ (Hsp40) homolog subfamily B member 5
215641_at	2.04	SEC24 related gene family member D (S. cerevisiae)
215888_at	2.037	Androgen-induced proliferation inhibitor
210362_x_at	2.036	promyelocytic leukemia
220712_at	2.033	chromosome 8 open reading frame 60
203213_at	2.033	Cell division cycle 2 G1 to S and G2 to M
201531_at	2.032	zinc finger protein 36 C3H type homolog (mouse)
211094_s_at	2.03	neurofibromin 1 (neurofibromatosis von Recklinghausen disease Watson disease)
207492_at	2.029	N-glycanase 1
218468_s_at	2.018	gremlin 1 cysteine knot superfamily homolog (Xenopus laevis)
213176_s_at	2.008	latent transforming growth factor beta binding protein 4
204948_s_at	2.006	folistatin
203499_at	2	EPH receptor A2
209612_s_at	0.5	alcohol dehydrogenase IB (class I) beta polypeptide
44669_at	0.5	Homo sapiens clone IMAGE:3626627 mRNA
202588_at	0.5	adenylate kinase 1
204282_s_at	0.499	phenylalanine-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)
203576_at	0.497	branched chain aminotransferase 2 mitochondrial
222309_at	0.497	Chromosome 6 open reading frame 62
219858_s_at	0.497	FLJ20160 protein
208199_s_at	0.496	zinc finger protein 161 homolog (mouse)
215071_s_at	0.496	histone 1 H2ac
218921_at	0.496	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain
213300_at	0.494	KIAA0404 protein
203662_s_at	0.494	tropomodulin 1
213116_at	0.494	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3
213493_at	0.494	sushi nidogen and EGF-like domains 1
201261_x_at	0.492	biglycan
222228_s_at	0.492	hypothetical protein FLJ20013
204273_at	0.492	endothelin receptor type B
220321_s_at	0.49	hypothetical protein FLJ13646
213716_s_at	0.489	secreted and transmembrane 1

213951_s_at	0.489	TBP-1 interacting protein
202997_s_at	0.488	lysyl oxidase-like 2
203019_x_at	0.488	synovial sarcoma X breakpoint 2 interacting protein
220943_s_at	0.488	hypothetical protein PRO1853
220242_x_at	0.487	zinc finger protein 701
202755_s_at	0.486	glypican 1
212552_at	0.485	hippocalcin-like 1
221894_at	0.485	aarF domain containing kinase 2
212484_at	0.485	family with sequence similarity 89 member B
211742_s_at	0.484	ecotropic viral integration site 2B ; ecotropic viral integration site 2B
206100_at	0.484	carboxypeptidase M
213172_at	0.483	tetratricopeptide repeat domain 9
205127_at	0.483	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
214699_x_at	0.478	(prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
49111_at	0.477	WIPI49-like protein 2
219453_at	0.476	MRNA; cDNA DKFZp762M127 (from clone DKFZp762M127)
218975_at	0.475	chromosome 16 open reading frame 44
209038_s_at	0.474	collagen type V alpha 3
202888_s_at	0.474	EH-domain containing 1
203933_at	0.474	alanyl (membrane) aminopeptidase
218350_s_at	0.474	(aminopeptidase N aminopeptidase M microsomal aminopeptidase CD13 p150)
200895_s_at	0.473	RAB11 family interacting protein 3 (class II)
214549_x_at	0.473	geminin DNA replication inhibitor
206645_s_at	0.471	FK506 binding protein 4 59kDa
212099_at	0.47	small proline-rich protein 1A
213425_at	0.469	nuclear receptor subfamily 0 group B member 1
203018_s_at	0.469	ras homolog gene family member B
209864_at	0.469	wingless-type MMTV integration site family member 5A ; wingless-type MMTV integration site family member 5A
213832_at	0.467	synovial sarcoma X breakpoint 2 interacting protein
220041_at	0.467	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2
211658_at	0.463	Clone 24405 mRNA sequence
221234_s_at	0.463	SMP3 mannosyltransferase
203115_at	0.463	peroxiredoxin 2 ; peroxiredoxin 2
57588_at	0.463	BTB and CNC homology 1 basic leucine zipper transcription factor 2 ; BTB and CNC homology 1 basic leucine zipper transcription factor 2
211610_at	0.462	ferrochelatase (protoporphyrin)
203180_at	0.462	solute carrier family 24
209900_s_at	0.461	(sodium/potassium/calcium exchanger) member 3
211741_x_at	0.461	Kruppel-like factor 6 ; Kruppel-like factor 6
49452_at	0.459	aldehyde dehydrogenase 1 family member A3
203386_at	0.459	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters) member 1
218234_at	0.458	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3 ; pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3
		acetyl-Coenzyme A carboxylase beta
		TBC1 domain family member 4
		inhibitor of growth family member 4

214290_s_at	0.458	histone 2 H2aa
214692_s_at	0.458	jerky homolog (mouse)
222297_x_at	0.458	Ribosomal protein L18
		SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily d member 2
201827_at	0.456	
206085_s_at	0.455	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
		D site of albumin promoter (albumin D-box)
209782_s_at	0.455	binding protein
205932_s_at	0.455	msh homeo box homolog 1 (Drosophila)
219167_at	0.454	RAS-like family 12
202247_s_at	0.453	metastasis associated 1
211173_at	0.453	cholecystokinin A receptor
207017_at	0.451	RAB27B member RAS oncogene family
205393_s_at	0.451	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
		alcohol dehydrogenase IB (class I) beta polypeptide
209613_s_at	0.451	
203817_at	0.451	guanylate cyclase 1 soluble beta 3
207180_s_at	0.451	HIV-1 Tat interactive protein 2 30kDa
		parathyroid hormone-like hormone ; parathyroid hormone-like hormone
211756_at	0.45	
206911_at	0.45	tripartite motif-containing 25
209724_s_at	0.45	zinc finger protein 161 homolog (mouse)
205640_at	0.448	aldehyde dehydrogenase 3 family member B1
		bone morphogenetic protein 8b (osteogenic protein 2)
221615_at	0.446	
		solute carrier family 14 (urea transporter) member 1 (Kidd blood group)
205856_at	0.446	
204569_at	0.444	intestinal cell (MAK-like) kinase
		aldehyde dehydrogenase 5 family member A1 (succinate-semialdehyde dehydrogenase)
203608_at	0.444	
210880_s_at	0.443	embryonal Fyn-associated substrate
201945_at	0.442	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)
216411_s_at	0.441	galactokinase 2
213989_x_at	0.44	chromosome 21 open reading frame 18
		low density lipoprotein receptor-related protein 8
208433_s_at	0.44	apolipoprotein e receptor
220465_at	0.439	hypothetical protein FLJ12355
209098_s_at	0.439	jagged 1 (Alagille syndrome)
202249_s_at	0.438	WD repeat domain 42A
219401_at	0.438	xylosyltransferase II
202191_s_at	0.437	growth arrest-specific 7
209099_x_at	0.437	jagged 1 (Alagille syndrome)
215977_x_at	0.436	glycerol kinase
205081_at	0.435	cysteine-rich protein 1 (intestinal)
213348_at	0.434	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57 Kip2)
219527_at	0.428	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2
209821_at	0.427	chromosome 9 open reading frame 26 (NF-HEV)
215506_s_at	0.427	DIRAS family GTP-binding RAS-like 3
208322_s_at	0.423	ST3 beta-galactoside alpha-2 3-sialyltransferase 1
32062_at	0.423	leucine rich repeat containing 14
89476_r_at	0.421	aminopeptidase-like 1
217165_x_at	0.419	metallothionein 1F (functional)
203665_at	0.419	heme oxygenase (decycling) 1
		melanoma antigen family D 4 ; melanoma antigen family D 4
221261_x_at	0.418	

209346_s_at	0.418	phosphatidylinositol 4-kinase type II
201418_s_at	0.415	SRY (sex determining region Y)-box 4
208161_s_at	0.415	ATP-binding cassette sub-family C (CFTR/MRP) member 3
213413_at	0.414	stoned B-like factor
219622_at	0.414	RAB20 member RAS oncogene family
207253_s_at	0.413	ubiquitin 1
210194_at	0.412	phospholipase A2 receptor 1 180kDa
202175_at	0.412	chondroitin polymerizing factor
204633_s_at	0.411	ribosomal protein S6 kinase 90kDa polypeptide 5
220178_at	0.41	chromosome 19 open reading frame 28
204205_at	0.407	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G
211966_at	0.407	collagen type IV alpha 2
210089_s_at	0.406	laminin alpha 4
209202_s_at	0.406	exostoses (multiple)-like 3
219103_at	0.403	development and differentiation enhancing factor-like 1
219050_s_at	0.401	zinc finger HIT type 2
213087_s_at	0.396	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)
214761_at	0.396	zinc finger protein 423
213668_s_at	0.393	SRY (sex determining region Y)-box 4
210663_s_at	0.39	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
211829_s_at	0.388	G protein-coupled receptor 30
220180_at	0.387	CTCL tumor antigen se57-1
209297_at	0.385	intersectin 1 (SH3 domain protein)
204040_at	0.384	ring finger protein 144
218620_s_at	0.382	HemK methyltransferase family member 1
207177_at	0.38	prostaglandin F receptor (FP)
209051_s_at	0.379	ral guanine nucleotide dissociation stimulator
204249_s_at	0.379	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
217388_s_at	0.378	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
216336_x_at	0.376	Metallothionein 1M
204457_s_at	0.376	growth arrest-specific 1
210933_s_at	0.376	fascin homolog 1 actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)
203649_s_at	0.373	phospholipase A2 group IIA (platelets synovial fluid)
202114_at	0.373	sorting nexin 2
217691_x_at	0.372	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters) member 3
206461_x_at	0.36	metallothionein 1H
209540_at	0.343	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
219686_at	0.337	serine/threonine kinase 32B
206994_at	0.335	cystatin S
202835_at	0.335	thioredoxin-like 4A
219837_s_at	0.335	cytokine-like 1
214717_at	0.329	hypothetical protein DKFZp434H1419
204835_at	0.323	polymerase (DNA directed) alpha
211029_x_at	0.311	fibroblast growth factor 18 ; fibroblast growth factor 18
213183_s_at	0.298	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p53 Kip2)
219230_at	0.292	hypothetical protein FLJ10970
211485_s_at	0.288	fibroblast growth factor 18

221552_at	0.285	abhydrolase domain containing 6
204385_at	0.262	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
201010_s_at	0.253	thioredoxin interacting protein
201009_s_at	0.244	thioredoxin interacting protein
		ATP synthase H ⁺ transporting mitochondrial F1
203926_x_at	0.225	complex delta subunit
205302_at	0.221	insulin-like growth factor binding protein 1
201008_s_at	0.206	thioredoxin interacting protein
201416_at	0.172	SRY (sex determining region Y)-box 4

Biomedical Journals

Targets hidden by fibrin networks still need to find their place in the armamentarium for rheumatoid arthritis --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	Biomedical Journals-15-2329R1
Full Title:	Targets hidden by fibrin networks still need to find their place in the armamentarium for rheumatoid arthritis
Short Title:	
Article Type:	Commentary
Section/Category:	Health Care : Current Reviews
Keywords:	rheumatoid arthritis, fibrin, synovial fibroblasts, toll-like receptor 4, peptidylarginine deiminase 2, synovitis
Corresponding Author:	Olga Sánchez Pernaute, MD, PhD SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Antonio Gabucio
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Antonio Gabucio Olga Sánchez Pernaute
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	SPAIN
Abstract:	
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	
Response to Reviewers:	<p>Dear Editor</p> <p>I would like to thank reviewers for their interesting comments, that have helped to improve the quality of our former manuscript.</p> <p>We have now re-written the manuscript taking into consideration their remarks. Point-by-point answers to their comments are enclosed below.</p> <p>Best regards,</p> <p>Olga S Pernaute.</p> <p>Reviewer #1:</p> <p>Since the article is a commentary, a purpose/intent statement might be in order at the manuscripts outset. It is only toward the end of the paper that the authors display their work and its worthiness in terms of a extension on the current science.</p>

	<p>Authors: In the new version, a purpose has been added at the first paragraph</p> <p>Also, in terms of reporting their work, their approach is rather subtle. The authors might consider referring to themselves and naming their studies work in the 3rd person and being a bit more bold. That is the purpose of this commentary, right?</p> <p>Authors: We have re-phrased the sentences quoting our previous research, which are now written in the 3rd person.</p> <p>Their conclusions needs to be re-written. "In conclusion, our work suggests the the potential for demonstrating..." And "As such (Thus), it has a vast potential to..."</p> <p>Authors: Conclusion has been re-written.</p> <p>Reviewer #2: Strengths:</p> <ul style="list-style-type: none">- reviewed manuscript meets focus of the journal and poses significant scientific and practical value,- the subject addressed in this article is worthy of review and investigation,- the information presented is relatively new,- there is need for further development of research,- title clearly describes the article,- scientific English used in the article allows to clearly understand the main purpose and ideas, sentences are cohesive. <p>Remarks:</p> <p>Structure of the manuscript is appropriate for commentary, but division into parts will clarify scientific and clinical backround, aim of the study (stated problem), discussion, and conclusions. This way discussion should emphasize limitations of previous studies, advantages and limitations of the proposed concept, and directions for further studies.</p> <p>Authors: A purpose has been inserted at the introductory paragraph and sections have been included. Following the reviewer's advice we now highlight relevant drawbacks regarding this field of research.</p>
--	---

Targets hidden by fibrin networks still need to find their place in the armamentarium for rheumatoid arthritis

Antonio Gabucio, Olga Sánchez-Pernaute

Bone & Joint Research Unit, Division of Rheumatology, Jiménez Díaz Foundation
University Hospital, Madrid, Spain

Correspondence to:

Olga Sánchez-Pernaute, MD

Division of Rheumatology

Jiménez Díaz Foundation University Hospital

Avda Reyes Católicos, 2

28040 Madrid

Spain

osanchez@fjd.es

Keywords: rheumatoid arthritis, fibrin, synovial fibroblasts, toll-like receptor 4, peptidylarginine deiminase 2, synovitis

The treatment of rheumatoid arthritis has undergone a huge revolution in the past two decades with the incoming of biological therapies, which have been designed out of a better understanding of pathogenic mechanisms. However, while these compounds successfully prevent -or at least slow down- joint damage in most of the patients, they all show an efficacy ceiling effect and their survival is limited. This reflects the complex and heterogeneous pathogenesis that characterises the disease, and is the reason why a continuous search for new strategies is necessary. In this context, the purpose of this commentary is to revisit intra-articular fibrin deposition as a yet little exploited approachable process in the treatment of rheumatoid arthritis. In the light of previous research, we underline the early place of fibrin in the pathogenic cascade as well as its involvement in the development of synovitis. In addition, we go through potentially targetable checkpoints and briefly discuss limitations to the development of fibrin-based therapies.

Fibrin deposition and the sequence from early to established disease

As we understand it today, rheumatoid arthritis is the result of a succession of events targeting susceptible hosts [1-3]. The disease is thought to start as a non-specific inflammatory arthritis following the incidence of a variety of inducing triggers [4-8]. Next, the unbalance between resolving and perpetuating mechanisms results in the amplification of the inflammatory process. With spreading of pro-inflammatory mechanisms, it evolves to a more specific, usually non-subsiding process, characterised by the generation of immune memory, or established rheumatoid arthritis [3]. Pro-inflammatory cytokines are considered principal mediators of this transition, and are currently the cornerstone in the design of biological therapies. However, cytokines are interconnected in networks, characterised by their pleiotropic actions and

multiplying circuits. These intricate interactions make it unlikely for cytokine-blocking drugs to completely stop the disease in the long run. It appears that therapeutic strategies should better be aimed at events upstream the cytokine induction in the pathogenic sequence.

Returning to early stages of the disease, joint swelling is associated to the effusion of plasma fibrinogen and zymogens to the joint cavity. Therefore, the struggle between resolving and perpetuating factors also involves clotting and fibrinolysis inside joints, and this battle is completely skewed towards fibrin deposition in rheumatoid hosts [8-13]. We can positively regard rheumatoid arthritis as an extravascular thrombophilia. The remarkable presence of fibrin in rheumatoid joints has been a matter of discussion for many years. A number of studies have addressed the specific alterations of extravascular hemostasis associated to the disease, the principal of which are summarised in Figure 1. On one hand there is an abnormally high procoagulant activity, with an increase in tissue factor (TF) and in plasminogen activator inhibitor (PAI) I [10]. On the other, fibrinolysis is not proportional, as reflects the down-regulation of urokinase-type plasminogen activator (uPA) [11]. In addition, citrullination taking place within inflamed joints might facilitate the procoagulant deregulation. This post-translational modification usually leads to functional alterations of the substrates, and has been found to hamper antithrombin enzymatic activity, as well as the digestion of fibrin [12]. Also the degrading rate of carboxypeptidase B (CPB) has been found decreased in rheumatoid joints [13].

Fibrin involvement in the development of synovitis

Synovitis, which is the defining feature of the disease, is thought to be a consequence of disease perpetuation. Synovitis can be defined as an invasive transformation of resident synovial cells leading to the destruction of cartilage and bone [14-16]. Studies based on histopathological findings have suggested that fibrin deposition could exert a

central role in the development of rheumatoid synovitis [17, 18]. Typically, the synovial tissue depicts in rheumatoid arthritis a mosaic-like architecture, in which areas of hypertrophic growth and invasion alternate with regions looking spared. One of the distinguishing features between these regions is precisely the presence of fibrin. Figure 2 shows a typical fibrin-rich region in a rheumatoid synovial tissue. In the photomicrograph, a high cell density, infiltration by macrophages, and fibrotic scarring can be observed. Positively, fibrin plays a physiological role in wound healing, promoting cell scatter through the matrix and its remodelling. It also contributes to transmigration of leukocytes through the vessels wall [19]. Using joint explants from patients undergoing prosthetic surgery, deposition of fibrin was shown at fronts of bone and cartilage invasion. In addition, fibrin co-localised with metalloproteinases 1 and 3, particularly at these sites [20]. All these facts led to propose a fibrin-based model for the development of synovitis based on the direct interaction between the fibrin networks and the resident fibroblasts [21].

Fibrin operates ahead of the cytokine network

This synovitis model was thereafter challenged using an in vitro system in which fibrinogen was immobilised with the addition of thrombin directly on top of cell monolayers, to form fresh fibrin clots. This system had been formerly introduced to study cell transmigration [19]. This approach showed a powerful up-regulation of inflammatory mediators, growth factors and transcriptional activators by fibrin in rheumatoid synovial fibroblasts in the absence of collaboration of immune cells [22]. The fibrin transcriptome in these cells included some of the major pathogenic mediators of rheumatoid arthritis, such as interleukin 6, a variety of chemokines, vascular cell adhesion protein 1, intracellular adhesion molecule 1, tumor necrosis factor-related peptides, cyclooxygenase 2, and histone deacetylases. As represented in Figure 3 (left panel) the toll-like receptor (TLR) 4 - nuclear factor kappa B axis was found to mediate fibrin-dependent gene induction in synovial fibroblasts, while a similar

pathway had been drawn in macrophages [22-24]. Globally, these findings support that synovial cells might, through their interaction with fibrin, fuel the principal pathogenic processes of rheumatoid arthritis, acting upstream cytokine networks and lymphocyte activation (illustrated in Figure 3, main panel).

Fibrin networks are scaffolds for multi-target approaches

Interestingly enough, the stimulatory action of fibrin in the rheumatoid synovial membrane involves multiple therapeutic targets yet to be explored. As the principal receptor of fibrin inside the inflamed joint, TLR4 stands as an ideal molecular target of the fibrin-dependent pathogenic pathway (illustrated in Figure 3); moreover considering that levels of expression of TLR have been found abnormally enhanced in rheumatoid synovial fibroblasts [25, 26]. We will find out in the years to come if this approach can succeed in treating rheumatoid arthritis, since inhibitors of TLR4 are already undergoing development for other diseases. However, because of its widespread expression and its relevant role in the defence to gram-negative germs, TLR4 is a sensitive target, and the risk-benefit ratio of its inhibition would need to be individually considered.

In addition, a characteristic of fibrin is its multiple cell and matrix interaction domains. Fibrin networks provide sites for crosslinking of additional matrix proteins, such as fibronectin (Figure 2 & 3) [18, 20]. The resulting multimolecular scaffold greatly enhances opportunities for cell attachment. It also offers binding sites for growth factors. Notably, vascular endothelium growth factor and fibroblastic growth factor 2 prolong their respective actions when anchored to fibrin networks [27, 28]. The number of potential targets within this route is therefore high, and probably differing between subgroups of patients.

Interestingly, fibrin and other components of the extracellular matrix undergo citrullination in rheumatoid joints, and this post-translational modification can further

enhance mechanisms of cell activation, as has been demonstrated (Figure 3) [22, 29-31]. In spite of not being specifically associated to the disease, this post-translational modification of peptides facilitates their recognition as autoantigens [32]. Moreover, the development of antibodies to citrullinated peptides is relatively restricted to the disease. Citrullination is carried out by the family of peptidyl deiminases (PAD), out of which PAD2 emerges as an attractive therapeutic target. Of all isoforms, PAD2 shows the higher affinity for fibrin domains in vitro, and it has been found to be enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthritis, as compared to osteoarthritis [33, 34]. An increase in PAD has been put in relationship with erosive disease, and the presence of anti citrullinated antibodies is currently considered a marker of severe disease [35]. Altogether, this suggests that particular subgroups of patients would benefit from the inhibition of PAD2 activity.

Limitations to the development of fibrin-based therapies

Two major criticisms have hindered the progression of fibrin research in rheumatoid arthritis. The first one derived from the extrapolation of histopathological findings in synovial tissues from end-stage disease. Fibrin was for a long time considered a bystander product of inflammation. This hurdle was overcome with the studies performed in experimental models, and more recently, when fibrin was shown to be a major autoantigen of the disease. The second point raised was the lack of specificity of intra-articular fibrin deposition. This drawback is shared by most studies approaching the invasive phenotype of rheumatoid synovial fibroblasts, which have failed to show intrinsic alterations. In concordance, our group has found a similar profile of gene induction in fibroblasts from osteoarthritic joints to the one depicted by rheumatoid fibroblasts upon exposure to fibrin (unpublished data). This rather supports that fibrin networks provide a microenvironmental imprinting, as responsible for the aggressive features of these cells. Besides, we did observe differences in the magnitude of the cell response between both conditions, probably due to the higher expression level of

TLR4 in rheumatoid as compared to osteoarthritic synovial fibroblasts, as has been observed [25, 26].

In conclusion, complexity of rheumatoid arthritis warrants a multi-target approach in order to shut down mechanisms involved in disease progression. In the next future, a better characterization of each phenotype will facilitate the use of tailored strategies, in which a place for fibrin-based therapies can be forecasted.

Acknowledgement: The authors' work was supported by the Conchita Rabago Foundation.

References

1. Svartz N (1975) The origin of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 6: 322-8 [[Pubmed](#)].
2. Yamamoto K (2013) Genetic analyses of rheumatoid arthritis. *Nihon Rinsho* 71: 1155-9 [[Pubmed](#)]
3. van Venrooij WJ and Pruijn GJ (2008) An important step towards completing the rheumatoid arthritis cycle. *Arthritis Res Ther* 10: 117 [[Pubmed](#)]
4. Ogrendik M (2013) Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease caused by periodontal pathogens. *Int J Gen Med* 6: 383-6 [[Pubmed](#)]
5. Alvarez-Lafuente R, Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S, Jover JA, Rollin R, et al. (2005) Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann Rheum Dis* 64: 1357-9 [[Pubmed](#)]
6. Balandraud N, Roudier J and Roudier C (2004) Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 3: 362-7 [[Pubmed](#)]
7. Toussiroit E and Roudier J (2008) Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 883-96 [[Pubmed](#)]
8. Chang X, Yamada R and Yamamoto K (2005) Inhibition of antithrombin by hyaluronic acid may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7: R268-73 [[Pubmed](#)]

9. Andersen RB and Gormsen J (1970) Fibrinolytic and fibrin stabilizing activity of synovial membranes. *Ann Rheum Dis* 29: 287-93 [\[Pubmed\]](#)
10. Salvi R, Peclat V, So A and Busso N (2000) Enhanced expression of genes involved in coagulation and fibrinolysis in murine arthritis. *Arthritis Res* 2: 504-12 [\[Pubmed\]](#)
11. Braat EA, Jie AF, Roday HK, Beekman B and Rijken DC (2000) Urokinase-mediated fibrinolysis in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients may be affected by the inactivation of single chain urokinase type plasminogen activator by thrombin. *Ann Rheum Dis* 59: 315-8 [\[Pubmed\]](#)
12. Chang X, Yamada R, Sawada T, Suzuki A, Kochi Y, et al. (2005) The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44: 293-8 [\[Pubmed\]](#)
13. Song JJ, Hwang I, Cho KH, Garcia MA, Kim AJ, et al. (2011) Plasma carboxypeptidase B downregulates inflammatory responses in autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 121: 3517-27 [\[Pubmed\]](#)
14. Firestein GS and Zvaifler NJ (2002) How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum* 46: 298-308 [\[Pubmed\]](#)
15. Bottini N and Firestein GS (2013) Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 9: 24-33 [\[Pubmed\]](#)
16. Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, et al. (2009) Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* 15: 1414-20 [\[Pubmed\]](#)
17. Sanchez-Pernaute O, Lopez-Armada MJ, Calvo E, Diez-Ortego I, Largo R, et al. (2003) Fibrin generated in the synovial fluid activates intimal cells from their apical surface: a sequential morphological study in antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42: 19-25 [\[Pubmed\]](#)
18. Sanchez-Pernaute O, Esparza-Gordillo J, Largo R, Calvo E, Alvarez-Soria MA, et al. (2006) Expression of the peptide C4b-binding protein beta in the arthritic joint. *Ann Rheum Dis* 65: 1279-85 [\[Pubmed\]](#)
19. Qi J, Goralnick S and Kreutzer DL (1997) Fibrin regulation of interleukin-8 gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 90: 3595-602 [\[Pubmed\]](#)
20. Sanchez-Pernaute O, Gabucio A, Jüngel A, Neidhart M, Comazzi M, et al. (2012) Innate Mechanisms of Synovitis – Fibrin Deposits Contribute

to Invasion, in Rheumatoid Arthritis - Etiology, Consequences and Co-Morbidities, Lemmey Da, Editor. InTech: Rijeka. 111-130 [\[Fulltext\]](#)

21. Sanchez-Pernaute O, Largo R, Calvo E, Alvarez-Soria MA, Egido J, et al. (2003) A fibrin based model for rheumatoid synovitis. *Ann Rheum Dis* 62: 1135-8 [\[Pubmed\]](#)
22. Sanchez-Pernaute O, Filkova M, Gabucio A, Klein M, Maciejewska-Rodrigues H, et al. (2012) Citrullination enhances the pro-inflammatory response to fibrin in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 72: 1400-6 [\[Pubmed\]](#)
23. Hodgkinson CP, Patel K and Ye S (2008) Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen. *Thromb Haemost* 100: 301-7 [\[Pubmed\]](#)
24. Smiley ST, King JA and Hancock WW (2001) Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167: 2887-94 [\[Pubmed\]](#)
25. Radstake TR, Roelofs MF, Jenniskens YM, Oppers-Walgreen B, van Riel PL, et al. (2004) Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum* 50: 3856-65 [\[Pubmed\]](#)
26. Xu D, Yan S, Wang H, Gu B, Sun K, et al. (2015) IL-29 Enhances LPS/TLR4-Mediated Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Cell Physiol Biochem* 37: 27-34 [\[Pubmed\]](#)
27. Sahni A and Francis CW (2000) Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood* 96: 3772-8 [\[Pubmed\]](#)
28. Sahni A, Odrlijin T and Francis CW (1998) Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 273: 7554-9 [\[Pubmed\]](#)
29. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, et al. (2003) Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2489-500 [\[Pubmed\]](#)
30. van Beers JJ, Raijmakers R, Alexander LE, Stammen-Vogelzangs J, Lokate AM, et al. (2010) Mapping of citrullinated fibrinogen B-cell epitopes in rheumatoid arthritis by imaging surface plasmon resonance. *Arthritis Res Ther* 12: R219 [\[Pubmed\]](#)
31. Chang X, Yamada R, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, et al. (2005) Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology (Oxford)* 44: 1374-82 [\[Pubmed\]](#)

32. Chapuy-Regaud S, Sebbag M, Baeten D, Clavel C, Foulquier C, et al. (2005) Fibrin deimination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitides. *J Immunol* 174: 5057-64 [[Pubmed](#)]
33. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, et al. (2007) Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum* 56: 3541-53 [[Pubmed](#)]
34. Kinloch A, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, et al. (2008) Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 2287-95 [[Pubmed](#)]
35. Turunen S, Koivula MK, Melkko J, Alasaarela E, Lehenkari P, et al. (2013) Different amounts of protein-bound citrulline and homocitrulline in foot joint tissues of a patient with anti-citrullinated protein antibody positive erosive rheumatoid arthritis. *J Transl Med* 11: 224 [[Pubmed](#)]

Legends to the Figures

Figure 1. Extravascular haemostasis in rheumatoid joints.

Figure 2. A fibrin-rich region from a rheumatoid synovial membrane. Hematoxylin-eosin staining shows scarring tissue with giant cells surrounding a solid deposit of fibrin (left). CD68 staining showing the infiltration of macrophages in the surroundings of the undigested fibrin deposit (middle). Fibronectin crosslinking with fibrin at the synovial interstitium (right).

Figure 3. Fibrin-dependent cell activation in rheumatoid synovitis. The upper right panel represents fibrin crosslinking with other extracellular matrix components and citrullination marks (red spots). The lower panel illustrates downstream events following interaction of resident cells with fibrin networks. The role of TLR4 in mediating fibrin-dependent cell activation is detailed at the left panel.

Innate Mechanisms of Synovitis – Fibrin Deposits Contribute to Invasion

Olga Sánchez-Pernaute¹ et al.*

¹Jiménez Díaz Foundation University Hospital, Madrid,
Spain

1. Introduction

1.1 Synovitis and the chicken or the egg dilemma

The studies approaching pathogenesis of rheumatoid arthritis shifted over the years to show that non-immune factors could precede activation of immune cells and were therefore targetable (Firestein & Zvaifler, 1990). In opposition to the classic model, in which an initial challenge to the immune system would over time lead to the autoimmune attack of joints, it was suggested that early mechanisms of disease induction were to be found inside joints. It was observed in vitro, that cells from the joints of patients with rheumatoid arthritis spontaneously produced several cytokines (Brennan et al., 1989a). Further studies would confirm the role of tumour necrosis factor alpha (TNF α) as a master cytokine, since its inhibition led to a drop in levels of the other soluble mediators (Brennan et al., 1989b), as well as reduction in the expression of HLA-DR molecules (Haworth et al., 1991). Interestingly, TNF α was not lymphocyte restricted, but rather pleiotropic. Moreover, it was shown that its principal sources in the arthritic joint were resident macrophages and fibroblast-like cells. This new paradigm was followed by the successful introduction of anti-cytokine therapies, which have totally changed the clinical picture of RA.

Indeed, the rheumatoid lesion at joints is quite unique, and probably sufficient to define the disease. It is characterized by the development of synovitis, a tumour-like transformation of the synovial tissue (Arend, 1997). On one hand, synovitis leads to joint destruction and disability, and on the other it provides a stronghold for spreading the inflammatory process.

1.2 Role of synovial fibroblasts in synovitis

1.2.1 Invasive features of synovial fibroblasts

There is not a uniform theory to explain how synovitis develops. However, one of the major features of synovitis is the acquisition of invasiveness of synovial fibroblasts. It could be said that rheumatoid synovial fibroblasts exhibit features of transformed cells, but unlike these, they do not show genetic aberrations. Rather, it seems that different activation processes are not correctly balanced by regulatory mechanisms in these cells. In this regard, it is typical of rheumatoid synovial fibroblasts to constitutively express growth factors, adhesion

* Antonio Gabucio¹, Astrid Jüngel², Michel Neidhart², María Comazzi², Gabriel Herrero-Beaumont¹, Renate E. Gay² and Steffen Gay²

²Zürich University Hospital, Zürich, Switzerland

molecules and proteases, which participate in inflammation and in the destruction of joint tissues (Pap et al., 2005).

One particularly altered regulatory mechanism in rheumatoid synovial fibroblasts is cell growth. In healthy individuals, the synovial membrane is formed by a limiting row of cells, the synovial intima, which overlays connective tissue in an epithelium-like fashion. In rheumatoid arthritis, the intimal layer is characteristically disarranged and hyperplastic (Tarner et al., 2005). Along with the infiltration by leukocytes, there is an increase in the density of synovial fibroblasts. However, the latter does not derive from a high proliferation rate, but from cell longevity. These cells are able to survive in adverse conditions, such as hypoxia and loss of matrix anchorage. Defective apoptosis might therefore be a critical process in acquisition of invasiveness, and different works have shed light on this, describing specific alterations in the regulation of death mechanisms in rheumatoid arthritis (Takami et al., 2003; Jüngel et al., 2006). But on the whole it could be said that the apoptotic machinery of rheumatoid synovial fibroblasts is not impaired, and most of its deregulation could be due to the influence of signals from the inflamed environment (Kammouni et al., 2007).

How rheumatoid synovial cells become invasive brings back the chicken or the egg dilemma. Are they mere effectors activated by immune cells or is it the activation of these cells by innate mechanisms what helps to trespass the barrier of peripheral tolerance, at the same time conferring them with aggressive features? Increasing evidence is rising supporting that local factors associated to inflammation can shape the phenotype of rheumatoid synovial fibroblasts. An intriguing feature of rheumatoid synovitis is local hypoxia (Stevens et al., 1991). The formation of new vessels is characteristic of synovitis, but still the density of blood vessels is insufficient to supply the overgrown tissue, so consequently there are focal areas of ischemia inside the inflamed joint. It has been shown that reduced oxygen leads to an activation of hypoxia sensitive elements, orchestrated by hypoxia induced transcription factor-1 (HIF-1). Apparently, there is a low threshold for the induction of the hypoxia program in rheumatoid arthritis, probably resulting from the stabilisation of HIF-1 by inflammatory cytokines. The vascular endothelium growth factor (VEGF) is one of the molecules induced by HIF-1 thought to play a prominent role in the acquisition of invasiveness by rheumatoid synovial fibroblasts (Distler et al., 2004).

1.2.2 Hurdles in the study of rheumatoid synovial fibroblasts' features

Synovitis is a non-conventional lesion, and it is difficult to put it into experimental coordinates in order to dissect its pathogenic mechanisms. Nonetheless, in primary cultures, rheumatoid synovial fibroblasts but not synovial fibroblasts from osteoarthritic or healthy joints, are able to maintain an activated phenotype after several passages. This rare feature suggests that cells carry with them a stable imprinting of the *in vivo* circumstances. However, *in vitro* studies have frequently failed to identify or consistently replicate mechanisms associated to acquisition of invasiveness by rheumatoid synovial fibroblasts. A possible explanation is that cells from the same joint can exhibit a heterogeneous spectrum of phenotypes (Kasperkovitz et al., 2005). In large synovial specimens, an alternation can be observed between overgrown sprouts of tissue (macroscopic villi) and normal-appearing areas, a finding that suggests that the aggressive transformation of synovial fibroblasts is focal. Studies based on primary cultures, as well as on high throughput techniques, can miss the features of small but critical subpopulations of cells.

In order to overcome these limitations, elegant strategies have been employed for the study of invasiveness of rheumatoid synovial fibroblasts. An interesting approach is to specifically look at areas where synovium invades cartilage and bone, the so-called cartilage-pannus junction (CPJ), looking for selective expression of molecules conferring invasiveness (Benito et al., 2004). From this type of study we have learned that cells located in the invasive fronts are mostly macrophages and fibroblasts. Both the up-regulation of anti-apoptotic factors, such as sentrin 1 and the Fas associated death domain-like interleukin 1 converting enzyme inhibitory protein (FLIP), and the expression of protooncogenes, have been found in these areas (Franz et al., 2000; Schedel et al., 2002). On the other hand, studies looking into CPJs are necessarily carried out in specimens obtained at the time of joint replacement surgery. Therefore, we need to be cautious at drawing conclusions, because these samples could reflect longstanding instead of active disease.

The invasive process has been studied *in vitro* in a transwell system with Matrigel, a method that was designed for the study of metastasis (Tolboom et al., 2002). More recently, a matrix-associated transepithelial resistance invasion (MATRIN) assay was developed to measure the rate of invasiveness from the breakdown of the electrical resistance generated by an epithelial monolayer (Wunrau et al., 2009). This system provides a means of directly assessing the participation of a particular factor in the ability of cells to scatter through the matrix. Also interesting are several three-dimensional co-culture systems in which minced, artificially generated, or native cartilage is put into contact with different subsets of cells that are present at the CPJ.

The experimental severe cellular immunodeficient (SCID) mouse co-implantation model allows the study of mechanisms of invasion *in vivo*. In this model, human cartilage and rheumatoid synovial fibroblasts are engrafted in nude mice, that is, in an immune independent environment. Several works using this model have shown the ability of rheumatoid synovial fibroblasts to migrate and to destroy cartilage in the absence of immune cell concurrence (Müller-Ladner et al., 1996). On the other hand, some mechanisms of destruction taking place in rheumatoid arthritis might not show up in the SCID mouse model, as the latter does not provide an inflammatory microenvironment comparable to synovitis (Jüngel et al, 2010).

1.2.3 The family of metalloproteinases and related molecules

There are probably several mechanisms accounting for cartilage and bone destruction in rheumatoid arthritis, and different cells and mediators can be involved. Activation of osteoclasts through the RANK ligand system stands as the principal pathway of bone erosion. In this sense, synovial fibroblasts, among other cell types, have an undeniable role as inductors of osteoclast differentiation and maturation in arthritic joints (Kim et al., 2007). But there is also much evidence of the direct ability of synovial fibroblasts to penetrate the adjacent joint structures as a result of their production of various proteases.

Metalloproteinases (MMPs) are a family of Zn^{2+} binding endoproteinases able to degrade the connective tissue. They are synthesized as precursors and cleaved at the N-terminus to their active forms. There is a considerable overlap of functions between them, and some of them are known to trigger the activation of others, as well as interact with additional proteases to generate proteolytic cascades in certain systems.

Of all MMPs, the interstitial collagenase, MMP-1, and stromelysin 1, or MMP-3, are the best characterized in the setting of synovitis. MMP-3 is able to degrade the most abundant extracellular components of the synovial tissue, including fibronectin and laminin, as well as

collagens I and III. In addition, it activates MMP-1, which not only shares some of MMP-3 cleavage targets, but is also able to degrade collagen II, the principal component of articular cartilage. Plasma levels of both proteases have been found to be increased in patients with rheumatoid arthritis (Manicourt et al., 1995). Moreover, they correlated with disease activity, while intra-joint concentrations of the enzymes increased in parallel with the degree of joint inflammation (Ishiguro et al., 1996). Plasma levels of MMP-3 are currently regarded as a surrogate marker of severity, a fact that reflects its relevance as a mediator of joint destruction in rheumatoid arthritis. With immune-detection techniques, MMP-1 and -3 show a patchy distribution throughout the inflamed synovial tissue. Both molecules are consistently found at CPJs, where a diffuse immune-reactivity has been described (Tetlow & Woolley, 1995). Their pattern of distribution has confirmed synovial fibroblasts as the major source of these molecules in the joint.

Also of interest are the group of membrane-anchored (MT-) MMPs, which are bound to integrin chains, and, upon activation, digest pericellular matrix. Of this family, MT1-MMP (also MMP-14), which is over-expressed in rheumatoid synovial fibroblasts, is thought to confer to these cells some of their invasive potential (Yamanaka et al., 2000). In this regard, experiments carried out in the SCID mouse co-implantation model have shown the participation of MMP-1 and MT1-MMP in the degradation of cartilage by rheumatoid synovial fibroblasts (Rutkauskaite et al., 2004; Rutkauskaite et al., 2005). Based on this evidence, the pathway of MMPs has been for a while a promising area of research for therapeutics, not only in rheumatoid arthritis but also in metastatic tumours. The members of the family of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs), which act as natural regulators of MMPs, appeared as ideal candidates to develop anti-invasive compounds. In the SCID mouse model, TIMP-1 and -3 over-expressing mutants were able to slow the invasive process (van der Laan et al., 2003). However, less convincing results have been drawn so far in therapeutic experimental approaches and clinical trials.

In summary, it appears that synovial fibroblasts are the main effectors of destruction, a fact that could be considered natural. Fibroblasts are in charge of connective tissue remodelling, both under physiologic conditions and in disease. Production of proteases allows them to migrate through the matrix and restore the injured site in wound healing processes (Woessner, 1991). The same mechanisms take place during invasive processes. In this regard, rheumatoid synovial fibroblasts have been compared to tumour-associated stromal cells, which are non-neoplastic fibroblasts that contribute to metastatic growth by the production of MMPs (Hotary et al., 2003). Interestingly, the presence of MMPs at the synovial tissue is not related to the stage of the disease, and in fact the proteases can be abundant in early synovitis (Katrib et al., 2001). Therefore, fibroblast activation is not necessarily a consequence of longstanding disease, but could be one of the distinguishing processes between non-progressive disease and rheumatoid arthritis.

To help understand why rheumatoid and not other synovial fibroblasts turn invasive, a revealing study put in relationship the mRNA expression levels of MMPs with local hypoxia. Not only hypoxic cultures resulted in an increase in MMP-1 and MMP-3 transcripts, but also HIF-1 α siRNA transfects yielded 50% lower mRNA levels of MMP-3 (Ahn et al., 2008).

Pulling the thread of research coming from invasive neoplasms and stromal cells, additional synovial fibroblast-dependent proteases were discovered at CPJs, showing potent in vitro capacity to destroy bone and cartilage. One of these molecules, that heralds the aggressive behaviour of tumours, is the urokinase type plasmin activator (uPA) (Duffy & Duggan,

2004). While uPA is able to degrade the extracellular matrix, it also activates MMPs and proteoglycanases through the cleavage of their precursors. Several studies have shown that uPA is over-expressed in joints from patients with rheumatoid arthritis, in correlation with disease severity (van der Laan et al., 2000). In spite of this role, uPA could be a double-edged therapeutic sword in rheumatoid arthritis, due to its activity in extra-vascular fibrinolysis, as we discuss in the next section. Interesting evidence was drawn in mice with antigen-induced arthritis, since uPA-deficient animals depicted a more severe phenotype as compared to wild type littermates (Busso et al., 1998). From subsequent studies, it can be concluded that aggressive features mediated by uPA are linked to its cell attachment activity, through the binding of its high affinity receptor, uPAR. New released work has found that the uPA-uPAR pair is a mediator of invasiveness in the SCID mouse co-implantation model (Serrati et al., 2011). In turn, uPAR is part of a larger complex, the urokinase plasminogen activating system (uPAS), formed by its assembly with 4 serin protease inhibitors at the cell surface. Triggering of uPAS is associated to proliferation, adhesion, migration and neoangiogenesis in tumours. These findings point to the complex as a better therapeutic target than the protease itself (Ullisse et al., 2009).

1.3 The role of fibrin in rheumatoid arthritis

1.3.1 Haemostasis activation overflows the fibrinolytic capacity in the joints with rheumatoid arthritis

Since the extra-vascular activation of haemostasis is a characteristic feature of inflammation, fibrin deposition in the inflamed synovial tissue is considered a non-specific event. During inflammation, the exudation of plasma into joints can result in coagulation factors achieving high concentrations at the synovial effusion. In fact, joints affected with osteoarthritis, infections, and trauma, often show fibrin deposits, albeit not as widespread as found in rheumatoid arthritis (Clemmensen et al., 1983). The striking abundance of fibrin in rheumatoid synovial tissues has been attributed to both an increased formation and a low clearance of the clots. As pointed out in different studies, rheumatoid arthritis flares provoke a status of extra-vascular thrombophilia, so that the influx of fibrinogen and its immobilization are high (Carmassi et al., 1996). Fibrin networks are thicker in patients with rheumatoid arthritis than in controls, and presumably more resistant to proteolysis as well (Kwasny-Krochin et al., 2010). This feature along with a reduced fibrinolytic activity can explain the accumulation of fibrin inside rheumatoid joints. Of the two regulatory systems that activate plasmin to degrade fibrin, the tissue plasminogen activator (tPA) is reduced in rheumatoid synovial tissues. Similarly, there is an increased production of the inhibitors of plasminogen activator, PAI-1 and PAI-2, which act by preventing fibrin dissolution through a constitutive pathway (Weinberg et al., 1991; Rønday, et al., 1996).

Local activation of complement is an inflammation-dependent mechanism that can help to stabilize fibrin clots thereby decreasing the fibrinolytic potential of the joint. In particular, we explored some years ago the local production of the regulatory factor C4b-binding protein (C4BP). The protein C-S anticoagulatory system is a principal mechanism for preventing the uncontrolled activation of haemostasis. The beta chain of C4BP binds protein S with high affinity in an equimolecular fashion (Dahlbäck, 1989). Only free protein S is active and the free fraction depends on the availability of C4BP beta. Reduced levels of free protein S are associated with an increased risk of thrombotic events. Interestingly, we showed local production of C4BP beta by rheumatoid synovial fibroblasts, as well as its co-localization with fibrin-rich areas at the synovial tissue (Sánchez-Pernaute et al., 2006). The

beta chain of C4BP has also been found in omen fibroblasts participating in the invasion and resorption of the corpus luteum, therefore indicating that besides its prothrombotic role, the molecule is important in fibroblast-dependent remodelling processes.

In the light of these experimental data, a potential participation of fibrin in synovitis has been argued by different groups including ourselves (Busso & Hamilton, 2002; So et al., 2003; Sánchez-Pernaute et al., 2003b), and several antithrombotic strategies have been tried, proving useful in attenuating the inflammatory process in experimental models of rheumatoid arthritis (Busso et al., 1998; Varisco et al., 2000).

1.3.2 Fibrin as an autoantigen

Fibrin is one of the major substrates for peptidyl deiminases (PAD) inside inflamed joints. These enzymes transform arginine residues into citrulline, and subsequently change the physical properties of the protein. This modification could alter binding sites of plasmin, making the polymer resistant to proteolytic degradation. Moreover, it can also turn the molecule antigenic (Schellekens et al., 1998). This fact was confirmed with the characterization of anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA), since they were shown to target epitopes from fibrin in a specific association with rheumatoid arthritis (Masson-Bessiere et al., 2001). Thus, fibrin can be considered a key mediator in the loss of immune tolerance in the disease. Since ACPA antibodies reach higher concentrations inside joints than at the periphery, deposition of fibrin in joints and exposure of its citrullinated form to immune-competent cells should be an early pathogenic event. On the other hand, ACPA can be found in pre-clinical stages in at least half of patients. To explain this contradiction, it has been suggested that the immune system is primed for citrullinated epitopes outside joints, for example in the lung or the oral cavity, with arthritis coming on a second wave (Quirke et al., 2011). We propose a different mechanism. According to recent studies, synovitis can remain asymptomatic during the first stages of the disease. A first mild flare of arthritis could, therefore, be the event during which citrullinated fibrinopeptides are generated inside joints and presented to the central immune system (van de Sande et al., 2011).

1.3.3 Fibrin as a scaffold

We focused our studies on “a non-immune” participation of fibrin in the development of synovitis. Since fibrin networks provide binding sites for the migration of cells, in this way facilitating wound healing, we proposed that the synovial tissue might grow through the engulfing of fibrin deposits at the lining surface. In a time-dependent approach, we studied events taking place from the first stages of the disease in antigen induced arthritis, and were able to describe the transition from acute inflammation, to deposition of fibrin clots, and subsequent synovitis-like tissue modifications taking place at fibrin-synovium interfaces (Sánchez Pernaute et al., 2003a). We then proposed that the binding of the free-surface of the lining cells would alter their polarity, thereby changing their resting phenotype into a migrating one, a mechanism that would contribute to invasiveness.

1.3.3.1 Immobilization of fibrin affects cell binding

Soluble fibrinogen turns into solid fibrin through the release of fibrinopeptides A and B, with the rest of its alpha and beta chains remaining mostly unchanged. Therefore, most cell binding sites are shared by the two macromolecules. But it is in our opinion the insolubility of fibrin which accounts for an invasive response of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. Experiments carried out in macrophages demonstrated that the binding affinity of

cells increases with fibrinogen transformation into fibrin (Shainoff et al., 1990). Considering that blood cells express different alpha beta integrin chains that could bind circulating fibrinogen, the affinity of the soluble molecule needs to be low. In this regard, the shear forces elicited by fibrin networks may have an influence in the avidity towards cell receptors. This mechanism has been recently found to account for activation of colon tumour cells upon engagement of fibrin by the hyaluronate receptor, CD44 (Alves et al., 2009).

The cell binding activity of fibrin networks is further enriched by its cross-linking with different matrix proteins, including collagens, proteoglycans or fibronectin, which also bear a variety of cell binding sites.

Yet to be understood, is why rheumatoid but not non-rheumatoid hosts develop an invasive response to fibrin clots inside joints. It could be simply a matter of magnitude, as we discussed several years ago (Sanchez-Pernaute et al., 2003b). It could also rely on intrinsic features of rheumatoid synovial fibroblasts, that up to date have not been found. Alternatively, it is attractive to speculate that resistance of the clots to plasmin proteolysis in rheumatoid joints makes local macrophages and fibroblasts secrete additional proteases that degrade fibrin through a non-constitutive pathway (Bini et al., 1999). Between these potential fibrin-degrading proteases stands MMP-3, which is also one of the major mediators of joint destruction. In this way, the active process of digestion of the insoluble macromolecule could be regarded as a favourable environment for the destruction of structures nearby.

1.3.4 A potential role of fibrin in the architecture of synovitis

The early works focused on the histopathology of rheumatoid arthritis, described a gradient in fibrin deposition from more abundant and solid-like at the surface, to patchy and reticular in inner areas (Andersen & Gormsen, 1970). Working with specimens from patients undergoing joint replacement surgery we described that fibrin-rich areas of the synovium were organized differently than non-fibrinous regions (Sánchez-Pernaute et al., 2006). With immune-detection techniques we found that both cells and extracellular matrix elements had a differential distribution in fibrinous and non-fibrinous areas, and there were transition zones between them (Figure 1). In this regard, matrix deposition and fibroblast-like synovial cells, as well as vessels, increased in density in fibrin-rich areas, up to an interface with solid-like fibrin deposits at superficial areas, where cells were scant and there were no vessels. Macrophages were clustered in the vicinity of fibrin deposits, although they were also abundant in non-fibrinous regions; but lymphoid aggregates clearly stayed apart (unpublished observations). This particular organization has led us to focus on the interaction between fibrin and synovial fibroblasts aiming to find mechanisms of invasiveness induced by fibrin in these cells.

Studies conducted in synovial specimens are frequently based on small biopsies. These explants constitute a fine way to reflect events taking place in the whole synovial tissue, in particular as regards cell activation and the participation of subtypes of infiltrating leukocytes (Smith et al., 2006). Elegant studies have proved that the pathology of the synovial tissue from biopsies can be employed to measure response to therapy and even unveil specific molecular predictive markers. However, this kind of study rarely describes the features of fibrin-rich areas, probably because in these regions the architecture of the tissue is distorted and difficult to read (as illustrated in figure 1). We believe that these areas are routinely discarded and thus critical components of the synovial pathology might be underestimated.

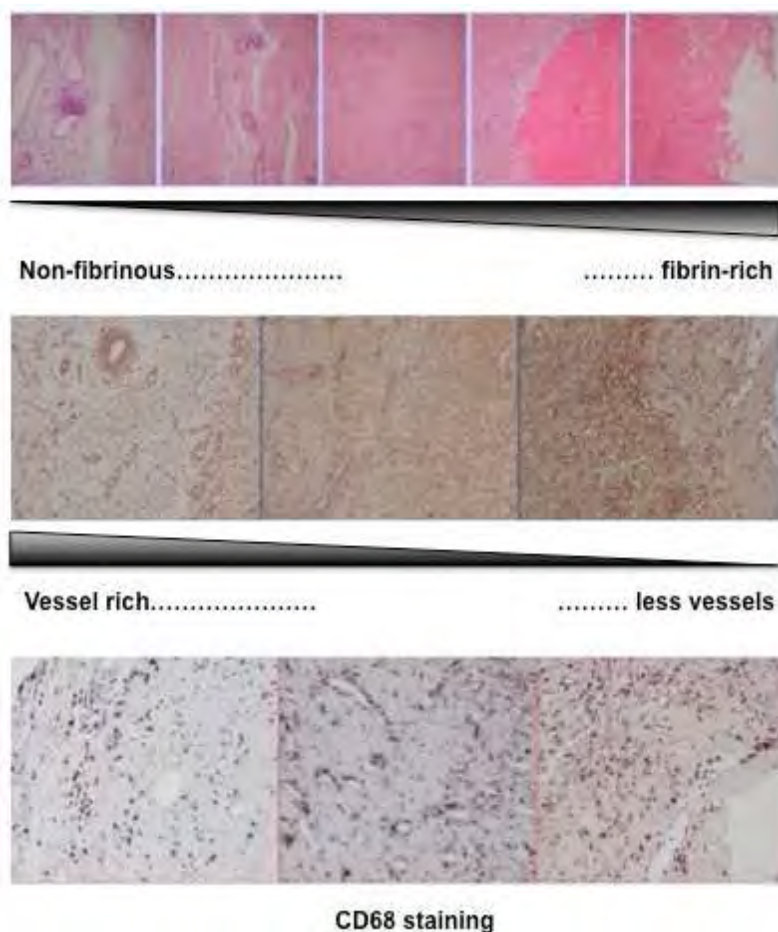


Fig. 1. Stratification of synovitis in relationship to fibrin deposits in a representative rheumatoid synovial tissue

Low-magnification microphotographs of a representative rheumatoid synovial tissue with an overlying fibrin deposit. Left column shows staining of the different tissue regions with haematoxylin-eosin. Middle column shows cell distribution with anti β actin antibodies. On the right side, immune-localization of macrophages with anti CD68 antibodies is shown.

2. Fibrin contributes to the production of MMP-1 and MMP-3 by rheumatoid synovial fibroblasts

In order to test whether deposition of fibrin might trigger the production of MMPs, we investigated the presence of fibrin in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. We observed a similar pattern of distribution to those of MMP-1 and -3. These findings led us to explore in vitro whether fibrin could activate the production of MMPs by rheumatoid synovial fibroblasts. In these studies, which we next describe, we introduced an

in vitro system that attempts to reproduce the interaction between fibrin and fibroblasts that takes place inside the joint. This model of cell stimulation had originally been developed to study leukocyte migration through vessel walls and is known as in situ fibrin polymerization (Qi & Kreutzer, 1995). In contrast to other types of cultures involving cells and matrix proteins, this approach conserves the shear forces of freshly clotted fibrin networks and exposes cells to the deposits by their apical surface.

2.1 Experimental methods

2.1.1 Obtention and handling of samples

Synovial tissues were obtained during joint replacement surgery from 8 patients with rheumatoid arthritis according to the American College of Rheumatology criteria (Arnett et al., 1988). For histologic studies, the synovial membrane was immediately fixed in formaldehyde, dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. When tissues included bone edges, they were decalcified by a 48 hour incubation in formic acid. For in vitro studies, cells were isolated by disruption with 1.5 mg/ml dispase II at 37°C for 1 hour in agitation, and cultured in 10% fetal calf serum (FCS) enriched Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 UI/ml penicillin-streptomycin, 0.2% amphotericin B, and 10 mM HEPES.

2.1.2 Immune-detection techniques

We studied the distribution of fibrin, MMP-1 and MMP-3 with double labelling immune-detection methods. Tissues were rehydrated, blocked with 6% bovine albumin and 3% serum of second antibody hosts, and incubated with the specific antibodies at 10 µg/ml overnight, at 4°C. Secondary antibodies were applied for 1 hour, at room temperature. As control, tissues were incubated with an isotype IgG from the species of primary antibodies. Development of fibrinogen immune-reactivity was done with peroxidase and Histogreen, using nuclear fast red for counterstaining. Diaminobenzidine was applied after a biotinylated secondary antibody to develop MMP-3, and counterstaining was done with hematoxylin. An alkaline phosphatase labelled antibody was employed to detect MMP-1, and nitroblue tetrazolium with 5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate was used as substrate for development, plus nuclear fast red as counterstaining. Inhibition of endogenous peroxidase was done with 1% H₂O₂ methanol. Alkaline phosphatase activity was blocked with 5 mM levamisole.

2.1.3 Fibrin-cell cultures

Between passages 4th and 7th cells were grown to confluence at 37°C in 5% CO₂, starved from serum during 48 hours and exposed to in situ clotted fibrin. Chilled fibrinogen was mixed in 0.5% foetal calf serum enriched DMEM at 1 mg/ml on ice, and 0.75 UI/ml thrombin was added. The mixture was immediately spread on top of the cell monolayers and the cultures were transferred to the incubator to allow formation of fibrin clots.

2.1.4 Gene expression studies

Four different cell cultures were employed. Cells were incubated with fibrin or medium alone for 12 hours. At the end of the incubation period, the clots and supernatants were removed, cells were washed and total RNA was isolated. Following retrotranscription, gene expression studies were done with quantitative PCR (qPCR) using cDNA as templates and

TaqMan primer-probe reagents (MMPs) or SYBR Green techniques (urokinase). Results were analysed following the $\Delta\Delta C_t$ method, using the expression of ribosomal 18s as house keeping gene and an untreated culture as reference.

2.1.5 Immunoblot techniques

Confluent cells were incubated with or without fibrin and protein levels of MMPs were measured at several time points. The protein levels of MMP-1 were determined in cells lysates as obtained with Laemmli's solution. Supernatants and fibrin were mixed with 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.2, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate and 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid, with 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM Na_3VO_4 , and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, at 4°C and homogenised. One hundred μ l of the homogenates were incubated with the anti MMP-3 antibody for 1 hour at 4°C. Then, protein A/G plus-agarose immunoprecipitation reagent (20 μ l) was added, and samples were incubated overnight on a rocking platform at 4°C. Finally, samples were washed and centrifuged to pellet beads with the complexed MMP-3, supernatants were discarded and precipitates were mixed in loading buffer. Protein extracts and immuno-precipitates were resolved in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose filters. The filters were then blocked with 5% skimmed milk and 0.03% Tween and blotted overnight with the specific antibodies. Horseradish peroxidase-labelled secondary antibodies were applied for 1 hour, at room temperature, and the binding was developed with enhanced chemiluminescence. Results were expressed as relative increase with regard to baseline. Beta-tubulin levels were used as control of cell protein content, and the Coomassie blue staining method was used in supernatants.

2.1.6 Statistics

Data are expressed as median (range); comparison between conditions was done with the non-parametric Wilcoxon rank test, using SPSS software.

2.1.7 Reagents and probes

Mouse anti human MMP-1 and goat anti human MMP-3 (R&D systems, Basel, Switzerland), goat anti human Fibrinogen (Abcam, Cambridge, UK), donkey anti goat-HRP, goat anti mouse-HRP, rabbit anti goat biotinylated antibodies, 1:500 in IHC, 1:10000 in WB (Jackson ImmunoResearch, LaRoche, Switzerland), goat anti mouse-alkaline phosphatase antibodies 1:40, Histogreen, nuclear fast red, DAB, peroxidase ABCComplex (Dako, Zug, Switzerland), NBT-BCIP (Roche), Protein A/G Plus Agarose Immunoprecipitation Reagent (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA), ECL chemoluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) Fetal calf serum, DMEM, penicillin, streptomycin, HEPES, fungizone (Life Technologies, Basel, Switzerland), dispase (Roche, Reinach, Switzerland), fibrinogen (American Diagnostica inc., Stamford, CT), mouse anti human tubulin, thrombin (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland) MiniRNeasy spin column purification kit, RNase-free DNase set (Qiagen, Basel, Switzerland), SYBR green master mix, ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland). Primer pairs and probes: MMP 1: 5'-tgttgaccatgccattgaga-3' (fwd), 5'-tctgcttgaccctcagagacc-3' (rev), FAM5'-ccaactctggagtaatgtcacacctctgacattcacc-3'-TAMRA (probe); MMP 3: 5'-gggccatcagaggaaatgag-

3' (fwd), 5'-cacggttgagggaacctca-3' (rev), FAM5'-agctggataccaagagcatccacac-3'TAMRA (probe); MMP 9: 5'-ggccactactgtgcctttgag-3' (fwd), 5'-gatggcgtcgaagatgttcac-3' (rev), FAM5'-ttgcaggcatcgtccaccgg-3'TAMRA (probe); MMP 13: 5'-tcctacaatctcgcgggaat-3' (fwd), gcatttctcggagcctctca-3' (rev), FAM5'-catggagcttgccttccttcag-3'TAMRA (probe); MMP 14: 5'-tggaggagacaccactttga-3' (fwd), 5'-gccaccaggaagatgtcatttc-3' (rev), FAM5'-cctgacagtcgaaggctcggcaga-3'TAMRA (probe); urokinase: 5'-tgtcagcagccccactactac-3' (fwd), 5'-cacagcattttggtggtgac-3' (rev).

2.2 Results

2.2.1 Fibrin and MMPs co-localized in the synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis

We studied the distribution of fibrin(ogen) in synovial tissues from 8 patients with rheumatoid arthritis. Three of them included areas of invasion into cartilage and bone. The binding was strong and abundant in all samples, showing either an amorphous or a reticular pattern, as has been described (Andersen & Gormsen, 1970; Clemmensen et al., 1983). Fibrin predominated in the vicinity of the lining layer. Solid-looking deposits were mostly acellular, while more organized material was found in interstitial areas, with cells inside also capturing the antibody. Fibrin immune-reactivity was strong at areas of interface with bone and cartilage.

Next, we studied the distribution of MMP-1 and MMP-3 in serial cuts of the same tissues, alone and in combination with fibrin, using double-staining methods. Immune-reactivity to both MMPs was high in the rheumatoid synovial tissues. Interestingly, MMP-1 predominated inside cells, and MMP-3 was mostly secreted. The binding of both antibodies was high at erosive fronts.

In double-staining studies, interstitial immune-reactivity to both MMP-1 and MMP-3 was associated with fibrin deposits. Furthermore, both proteases co-localized with fibrin at the invasive fronts. Fibroblast-like cells in fibrin-rich areas depicted a strong immune-reactivity to MMP-1 and MMP-3. These findings indicated that fibrin-rich areas were at the same time active sites of protease production.

2.2.2 Gene expression of proteases in rheumatoid synovial fibroblasts exposed to fibrin clots

In view of these observations, we carried out in vitro studies to look into a possible effect of fibrin on the production of proteases by rheumatoid synovial fibroblasts.

Thus, we studied five members of the MMP family that are prominent effectors of cartilage and bone destruction in rheumatoid arthritis. This revealed that exposure to in situ clotted fibrin resulted in the up-regulation of the gene expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 to a variable extent in all cell cultures (Figure 3). The mRNA levels of MMP-1 were 26-fold increased (range: 1.5 to 71; $p < 0.07$), and those of MMP-3 were 27-fold increased (range: 2 to 126; $p < 0.07$). MMP-9 gene expression was increased 7-fold the presence of fibrin (range: 3 to 39; $p < 0.07$), while no differences were found in the gene expression of MMP-13 and MMP-14. Additionally, we studied urokinase gene expression, since it is the constitutive fibrin-degrading molecule, and a potential mediator of tissue injury in rheumatoid synovial tissues. In our conditions, fibrin did not elicit any changes in urokinase mRNA levels compared to baseline.

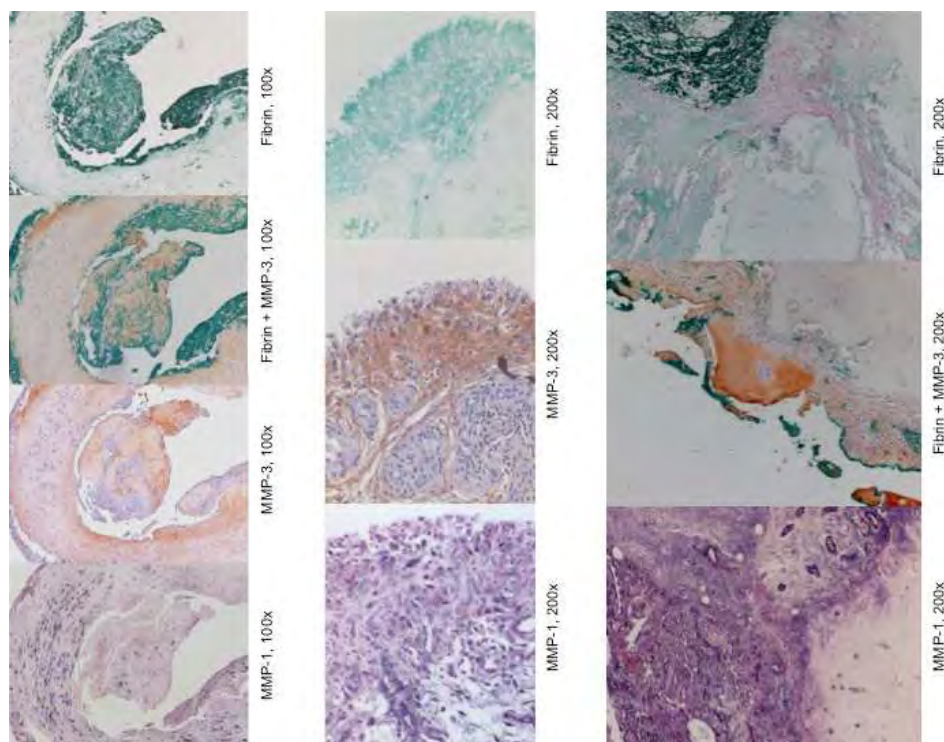


Fig. 2. Immune-staining of fibrin and MMPs in the rheumatoid synovial tissues

Left column shows a low-magnification view of a fibrin-rich area of the synovial tissue, with the different staining techniques. Middle column shows the intimal layer of a fibrin-rich area in detail. Right column depicts the staining of the molecules at areas of invasion into bone and cartilage. Fibrin is shown in green (with red counterstaining), MMP-3 is shown in brown (and counterstained in blue), and MMP-1 is shown in blue (with red counterstaining).

2.2.3 Fibrin increased the production of MMP-1 by rheumatoid synovial fibroblasts

Six different cell cultures were employed in immunoblot experiments. In all cases, treatment with fibrin increased MMP-1 production. In our conditions, both the proenzyme and the active form of MMP-1 increased between 18 h and 24 h in rheumatoid synovial fibroblasts treated with fibrin (Figure 3). At 24 h, the active enzyme increased to 4-fold as compared to untreated cells (range: 1.5 to 6; $p < 0.03$). On the other hand, we could not detect MMP-3 in cell lysates, but it was abundantly found in supernatants from cell cultures. Upon stimulation with fibrin, baseline levels of MMP-3 in supernatants were found increased only in half of the cell lines tested (ns) (Figure 3).

2.3 Discussion and future research

Our studies illustrate how deposition of fibrin can contribute to the invasive process in rheumatoid arthritis. Previous works had described the distribution of MMP-1 and MMP-3 in the rheumatoid synovial tissue. In the same way, fibrin distribution in rheumatoid joints

was well known. A novel finding is that all three followed a similar pattern of distribution. We could also confirm their abundance at CPJs, although we cannot draw conclusions as regards the impact of these finding in the erosive tendency.

Our studies suggest that fibrin triggers the transcription of several MMPs and the production of MMP-1. However, the study of MMPs is complex. These molecules are secreted in the form of zymogens, and need in situ activation through the cleavage of an N-terminus peptide. This post-translational modification probably constitutes a major check-point for the regulation of MMPs. Additionally, to find out what the global matrix turn-over could be, it would have been desirable to assess levels of TIMPs. TIMPs are the natural regulators of MMPs, an effect carried out through an equimolecular binding and inactivation. Both chondrocytes and synovial fibroblasts can produce TIMPs. In this regard, the balance between TIMPs and MMPs is decisive for the outcome (Martel-Pelletier et al., 1994). Functional studies, such as substrate-based zymography, are usually performed to demonstrate active proteolysis.

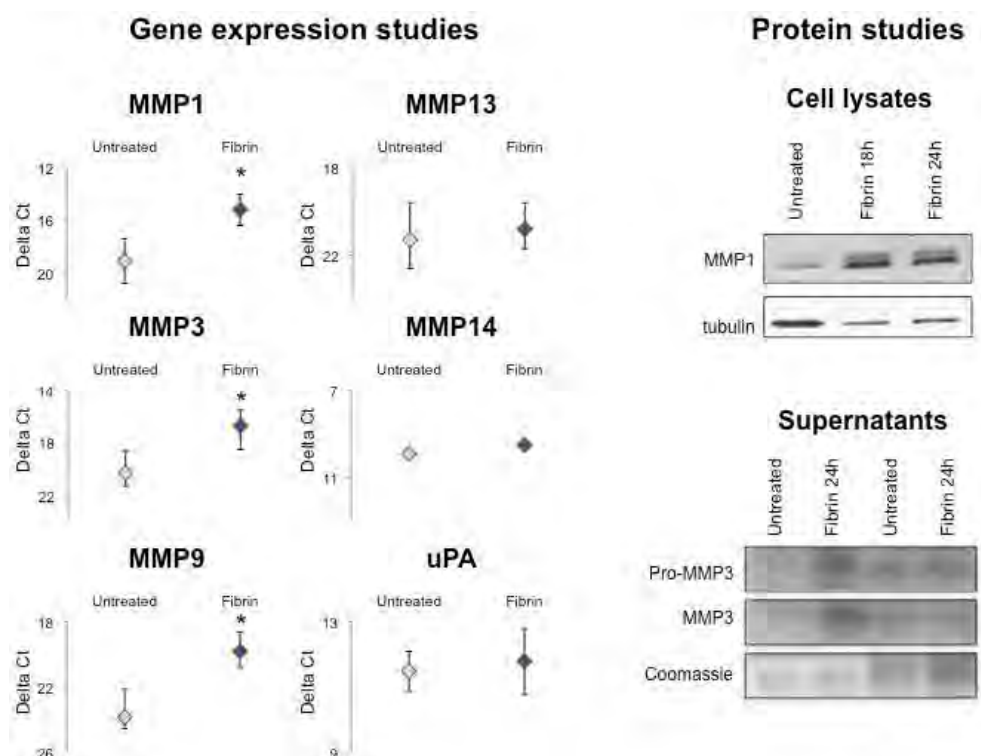


Fig. 3. Expression of MMPs in rheumatoid synovial fibroblasts exposed to fibrin

Graphs on the left show changes in baseline level expression of the mentioned genes (median \pm SEM), in Δ Ct values using 18s as house keeping gene (the lower Δ Ct values, the higher gene levels are). On the right, representative immunoblots from different experiments are shown. Detection of MMP-1 was done in cell lysates and MMP-3 was

studied in the extracellular fraction. Both antibodies detected both the zymogen (upper band) and the active protease (lower band).

Nevertheless, it was interesting to find that three MMPs previously correlated to the invasive potential of rheumatoid synovial fibroblasts, were up-regulated by fibrin at the mRNA level (Tolboom et al., 2002). Due to its insolubility, fibrin might be degraded in a non-constitutive way by MMP-3 secreted by surrounding cells (Bini et al., 1999). On the balance of the evidence, we believe that fibrin-rich regions should not be considered a result of long-standing inflammation, but a site for active destruction.

In agreement with previous studies, most of the synovial fibroblast cultures that we employed in our studies did not constitutively express MMP-13 as assessed with qPCR techniques, and only in some was it induced after exposure to fibrin (Moore et al., 2000). In the production of this, as well as the other proteases tested, there seemed to be a high variability between patients. In fact, our studies suggested the existence of two subsets according to their response to fibrin. Approximately half of the cultures strongly reacted with the up-regulation of MMPs, while the other half showed mild or absent response. We believe that this is another example of the heterogeneous character of rheumatoid arthritis.

Although there was no regulation of MT1-MMP at the mRNA level by fibrin, an interesting finding drawn by our experiments was the high expression of MT1-MMP by unstimulated rheumatoid synovial cells, pointing to the prominent role of the protease in the activity of synovial fibroblasts as already suggested (Miller et al., 2009).

In summary, using a novel culture system for the study of fibrin interaction with synovial cells, we could show induction of proteases putatively associated to invasiveness, that were further localized at fibrin-rich areas in the synovial tissues.

3. Conclusion

In this chapter, we give an overview of the role of fibrin in the pathogenesis of synovitis. In doing so, we have neither solved the paradigm about what starts first nor discovered what triggers the invasive behaviour of rheumatoid synovial fibroblasts. Instead we provide some lines of thinking supporting the “inside – out pathway” as it has recently been named (Schett & Firestein, 2010).

The “fibrin pathway” has been little explored in rheumatoid arthritis therapeutics. The balance between clotting and dissolution of fibrin is a candidate process to target that could help to retard joint destruction.

4. Acknowledgements

We thank Conchita Rábago Foundation (FCR) and the Foundation of the Spanish Society for Rheumatology (FER) for their financial support.

5. References

- Ahn, J.K.; Koh, E.M., Cha, H.S., Lee, Y.S., Kim, J., Bae, E.K. & Ahn, K.S. (2008). Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced expression of IL-8, MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)*, Vol.47, No.6, pp. 834-839, ISSN: 1462-0324

- Alves, C.S.; Yakovlev, S., Medved, L. & Konstantopoulos, K. (2009). Biomolecular characterization of CD44-fibrin(ogen) binding: distinct molecular requirements mediate binding of standard and variant isoforms of CD44 to immobilized fibrin(ogen). *J Biol Chem*, Vol.284, No.2, pp. 1177-1189, ISSN: 0021-9258
- Andersen, R.B. & Gormsen, J. (1970). Fibrinolytic and fibrin stabilizing activity of synovial membranes. *Ann Rheum Dis*, Vol.29, No.3, pp. 287-293, ISSN: 0003-4967
- Arend, W.P. (1997). The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.40, No.4, pp. 595-597, ISSN: 0004-3591
- Arnett, F.C.; Edworthy, S.M, Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S. et al. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.31, No.3, pp. 315-324, ISSN: 0004-3591
- Benito, M.J.; Murphy, E., Murphy, E.P., van den Berg, W.B., Fitzgerald, O. & Bresnihan, B. (2004). Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.50, No.6, pp. 1781-1787, ISSN: 0004-3591
- Bini, A.; Wu, D., Schnuer, J. & Kudryk, B.J. (1999). Characterization of stromelysin 1 (MMP-3), matrilysin (MMP-7), and membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) derived fibrin(ogen) fragments D-dimer and D-like monomer: NH2-terminal sequences of late-stage digest fragments. *Biochemistry*, Vol.38, No.42, pp. 13928-13936, ISSN: 0006-2960
- Brennan, F.M.; Chantry, D., Jacksin, A.M., Maini, R.N. & Feldmann, M. (1989). Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane. *J Autoimmun*, Vol.2 Suppl, pp. 177-186, ISSN: 0896-8411
- Brennan, F.M.; Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. & Feldmann, M. (1989). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*, Vol.2, No.8657, pp. 244-247, ISSN: 0140-6736
- Busso, N.; Peclat, V., Van Ness, K., Kolodzieczyk, E., Degen, J., Bugge, T. & So, A. (1998). Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. *J Clin Invest*, Vol.102, No.1, pp. 41-50, ISSN: 0021-9738
- Busso, N. & Hamilton, J.A. (2002). Extravascular coagulation and the plasminogen activator/plasmin system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.46, No.9, pp. 2268-2279, ISSN: 0004-3591
- Carmassi, F.; de Negri, F., Morale, M., Song, K.Y. & Chung, S.I. (1996). Fibrin degradation in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients: a model for extravascular fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost*, Vol.22, No. 6, pp. 489-496, ISSN: 0094-6176
- Clemmensen, I.; Holund, B. & Andersen, R.B. (1983). Fibrin and fibronectin in rheumatoid synovial membrane and rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum*, Vol.26, No.4, pp. 479-485, ISSN: 0004-3591
- Dahlbäck, B. (1986). Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J Biol Chem*, Vol.261, No.26, pp. 12022-12027, ISSN: 0021-9258
- Distler, J.H.W.; Wenger, R.H., Gassmann, M., Kurowska, M., Hirth, A., Gay, S. & Distler, O. (2004). Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.50, No.1, pp. 10-23, ISSN: 0004-3591

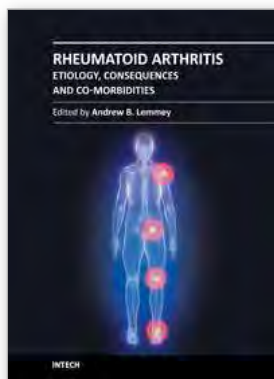
- Duffy, M.J. & Duggan, C. (2004). The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem*, Vol.37, No.7, pp. 541-548, ISSN: 0009-9120
- Firestein, G.S. & Zvaifler, N.J. (2002). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum*, Vol.46, No.2, pp 298-308, ISSN: 0004-3591
- Franz, J.K.; Pap, T., Hummel, K.M., Nawrath, M., Aicher, W.K., Shigeyama, Y. et al. (2000). Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.43, No.3, pp. 599-607, ISSN: 0004-3591
- Haworth, C.; Brennan, F.M., Chantry, D., Turner, M., Maini, R.N. & Feldmann, M. (1991). Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol*, Vol.21, No.10, pp. 2575-2579, ISSN: 1521-4141
- Hotary, K.B.; Allen, E.D., Brooks, P.C., Datta, N.S., Long, M.W. & Weiss, S.J. (2003). Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell*, Vol.114, No.1, pp. 33-45, ISSN: 0092-8674
- Ishiguro, N.; Ito, T., Obata, K., Fujimoto, N. & Iwata, H. (1996). Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, Vol.23, No.9, pp. 1599-1604, ISSN: 0315-162X
- Jüngel, A.; Baresova, V., Ospelt, C., Simmen, B.R., Michel, B.A., Gay, R.E. et al. (2006). Trichostatin A sensitises rheumatoid arthritis synovial fibroblasts for TRAIL-induced apoptosis. *Ann Rheum Dis*, Vol.65, No.7, pp. 910-912, ISSN: 0003-4967
- Jüngel, A.; Ospelt, C., Lesch, M., Thiel, M., Sunyer, T., Schorr, O. et al. (2010). Effect of the oral application of a highly selective MMP-13 inhibitor in three different animal models of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, Vol.69, No.5, pp. 898-902, ISSN: 0003-4967
- Kammouni, W.; Wong, K, Ma, G., Firestein, G.S., Gibson, S.B. & El-Gabalawy, H.S. (2007). Regulation of apoptosis in fibroblast-like synoviocytes by the hypoxia-induced Bcl-2 family member Bcl-2/Adenovirus E1B 19-kd protein-interacting protein 3. *Arthritis Rheum*, Vol.56, No.9, pp. 2854-2863, ISSN: 0004-3591
- Kasperkovitz, P.V.; Timmer, T.C., Smeets, T.J., Verbeet, N.L., Tak, P.P., van Baarsen, L.G. et al. (2005). Fibroblast-like synoviocytes derived from patients with rheumatoid arthritis show the imprint of synovial tissue heterogeneity: evidence of a link between an increased myofibroblast-like phenotype and high-inflammation synovitis. *Arthritis Rheum*, Vol.52, No.2, pp. 430-441, ISSN: 0004-3591
- Katib, A.; Tak, P.P., Bertouch, J.V., Cuello, C., McNeil, H.P., Smeets, T.J. et al. (2001). Expression of chemokines and matrix metalloproteinases in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, Vol.40, No.9, pp. 988-994, ISSN: 1462-0324
- Kim, K.W.; Cho, M.L., Lee, S.H., Oh, H.J., Kang, C.M., Ju, J.H. et al. (2007). Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation. *Immunol Lett*, Vol.110, No.1, pp. 54-64, ISSN: 0165-2478

- Kwasny-Krochin, B.; Gluszek, P. & Undas, A. (2010). Unfavorably altered fibrin clot properties in patients with active rheumatoid arthritis. *Thromb Res*, Vol.126, No.1:e11-6, ISSN: 1879-2472
- Manicourt, D.H.; Fujimoto N., Obata, K. & Thornall E.J. (1995). Levels of circulating collagenase, stromelysin-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of antigenic keratan sulfate and systemic parameters of inflammation. *Arthritis Rheum*, Vol.38, No.8, pp. 1031-1039, ISSN: 0004-3591
- Martel-Pelletier, J.; McCollum, R., Fujimoto, N., Obata, K., Cloutier, J.M. & Pelletier- J.P. (1994). Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest*, Vol.70, No.6, pp. 807-815, ISSN: 0023-6837
- Masson-Bessière, C.; Sebbag, M., Girbal-Neuhausser, E., Nogueira, L., Vincent, C., Senshu, T. & Serre, G. (2001). The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol*, Vol.166, No.6, pp. 4177-4184, ISSN: 0022-1767
- Moore, B.A.; Aznavoorian, S., Engler, J.A. & Windsor, L.J. (2000). Induction of collagenase-3 (MMP-13) in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, Vol.1502, No.2, pp. 307-318, ISSN: 0006-3002
- Müller-Ladner, U.; Kriegsmann, J., Franklin, B.N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R.E. & Gay, S. (1996). Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol*, Vol.149, No.5, pp. 1607-1615, ISSN: 0002-9440
- Pap, T.; Shigeyama, Y., Kuchen, S., Fernihough, J.K., Simmen, B., Gay R.E. & et al. (2000). Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.43, pp. 1226-1232, ISSN: 0004-3591
- Pap, T.; Nawrath, M., Heinrich, J., Bosse, M., Baier, A. & Hummel, K.M. (2004). Cooperation of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.50, No.9, pp. 2794-2802, ISSN: 0004-3591
- Pap, T.; Meinecke, I., Müller-Ladner, U. & Gay, S. (2005). Are fibroblasts involved in joint destruction? *Ann Rheum Dis*, Vol.64, Suppl4, pp. iv52-54, ISSN: 0003-4967
- Qi, J. & Kreutzer, D.L. (1995). Fibrin activation of vascular endothelial cells. Induction of IL-8 expression. *J Immunol*, Vol.155, No.2, pp. 867-876, ISSN: 0022-1767
- Quirke, A.M.; Fisher, B.A., Kinloch, A.J. & Venables, P.J. (2011). Citrullination of autoantigens: Upstream of TNF α in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*, Jun 23, [Epub ahead of print], ISSN: 1873-3468
- Ronday, H.K.; Smits, H.H., Van Muijen, G.N., Pruszczynski, M.S., Dolhain, R.J. et al. (1996). Difference in expression of the plasminogen activation system in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol*, Vol. 35, No.5, pp. 416-423, ISSN: 0263-7103
- Rutkauskaite, E., Zacharias, W., Schedel, J., Müller-Ladner, U., Mawrin, C., Seemayer, C.A., et al. (2004). Ribozymes that inhibit the production of matrix metalloproteinase 1 reduce the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, Vol.50, 1448-1456, ISSN: 0004-3591

- Rutkauskaite, E.; Volkmer, D., Shigeyama, Y., Schedel, J., Pap, G., Müller-Ladner, U. et al. (2005). Retroviral gene transfer of an antisense construct against membrane type 1 matrix metalloproteinase reduces the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, Vol.52, No.7, pp. 2010-2014, ISSN: 0004-3591
- Sánchez-Pernaute, O.; López-Armada, M.J., Calvo, E., Díez-Ortego, I., Largo, R., Egido, J. & Herrero-Beaumont, G. (2003). Fibrin generated in the synovial fluid activates intimal cells from their apical surface: a sequential morphological study in antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, Vol.42, No.1, pp. 19-25, ISSN: 1462-0324
- Sánchez-Pernaute, O.; Largo, R., Calvo, E., Alvarez-Soria, M.A., Egido, J. & Herrero-Beaumont, G. (2003). A fibrin based model for rheumatoid synovitis. *Ann Rheum Dis*, Vol.62, No.12, pp. 1135-1138, ISSN: 0003-4967
- Sánchez-Pernaute, O.; Esparza-Gordillo, J., Largo, R., Calvo, E., Alvarez-Soria, M.A., Marcos, M.E. et al. (2006). Expression of the peptide C4b-binding protein beta in the arthritic joint. *Ann Rheum Dis*, Vol.65, No.10, pp. 1279-1285, ISSN: 0003-4967
- Schedel, J.; Gay, R.E., Kuenzler, P., Seemayer, C., Simmen, B., Michel, B.A. & Gay, S. (2002). FLICE-inhibitory protein expression in synovial fibroblasts and at sites of cartilage and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.46, No.6, pp. 1512-1518, ISSN: 0004-3591
- Schellekens, G.A.; de Jong, B.A.W., van den Hoogen, F.H.J., van de Putte, L.B.A. & van Venrooij, W.J. (1998). Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*, Vol.101, No.1, pp. 273-281, ISSN: 0021-9738
- Schett, G. & Firestein, G.S. (2010). Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, Vol.69, No.5, pp. 787-789, ISSN: 0003-4967
- Serrati, S.; Margheri, F., Chillà, A., Neumann, E., Müller-Ladner, U., Benucci, M. et al. (2011). Reduction of in vitro invasion and in vivo cartilage degradation in a SCID mouse model by loss of function of the fibrinolytic system of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, May 5, doi: 10.1002/art.30439, ISSN: 1529-0131
- Shainoff, J.R.; Stearns, D.J., DiBello, P.M. & Hishikawa-Itoh, Y. (1990). Characterization of a mode of specific binding of fibrin monomer thorough ist amino-terminal domain by macrophages and macrophage cell-lines. *Thromb Haemost*, Vol.63, No.2, pp. 193-203, ISSN: 0340-6245
- Smeets, T.J.; Kraan, M.C., Galjaard, S., Youssef, P.P., Smith, M.D. & Tak, P.P. (2001). Analysis of the cell infiltrat and expression of matrix metalloproteinases and granzyme B in paired synovial biopsy specimens from the cartilage-pannus junction in patients with RA. *Ann Rheum Dis*, Vol.60, pp. 561-565, ISSN: 0003-4967
- Smith, M.D.; Baeten, D., Ulfgren, A.K., McInnes, I.B., Fitzgerald, O., Bresnihan, B. et al. (2006). Standarisation of synovial tissue infiltrate analysis: how far have we come? How muc further do we need to go? *Ann Rheum Dis*, Vol.65, No.1, pp. 93-100, ISSN: 0003-4967
- So, A.K.; Varisco, P.A., Kemkes-Matthes, B., Herkenne-Morard, C., Chobaz-Péclat, V., Gerster, J.C. & Busso, N. (2003). Arthritis is linked to local and systemic activation of coagulation and fibrinolysis pathways. *J Thromb Haemost*, Vol.1, No.12, pp. 2510-2515, ISSN: 1538-7933

- Stevens, C.R.; Blake, D.R., Merry, P., Revell, P.A. & Levick, J.R. (1991). A comparative study by morphometry of the microvasculature in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, Vol.34, No.12, pp. 1508-1513, ISSN: 0004-3591
- Takami, N.; Osawa, K., Miura, Y., Komai, K., Taniguchi, M., Shiraishi, M. et al. (2006). Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum*, Vol.54, No.3, pp. 779-787, ISSN: 0004-3591
- Tarner, I.H.; Härle, P., Müller-Ladner, U., Gay, R.E. & Gay, S. (2005). The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, Vol.19, No.1 pp. 19-35, ISSN: 1521-6942
- Tetlow, L.C. & Woolley, D.E. (1995). Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis*, Vol.54, No.11, pp. 896-903, ISSN: 0003-4967
- Tolboom, T.C.; Pieterman, E., van der Laan, W.H., Toes, R.E., Huidekoper, A.L., Nelissen, R.G. et al. (2002). Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Ann Rheum Dis*, Vol.61, No.11, pp. 975-980, ISSN: 0003-4967
- Ullisse, S.; Baldini, E., Sorrenti, S. & D'Armiento, M. (2009). The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, Vol.9, No.1, pp. 32-71, ISSN: 1568-0096
- van de Sande, M.G.; de Hair, M.J., van der Leij, C., Klarenbeek, P.L., Bos, W.H., Smith, M.D. et al. (2011). *Ann Rheum Dis*, Vol.70, No.5, pp. 77-777, ISSN: 0003-4967
- van der Laan, W.H.; Pap, T., Runday, H.K., Grimbergen, J.M., Huisman, L.G., TeKoppele, J.M. et al. (2000). Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of a cell surface-targeted plasmin inhibitor. *Arthritis Rheum*, Vol.43, No.8, pp. 1710-1718, ISSN: 0004-3591
- van der Laan, W.H.; Quax, P.H., Seemayer, C.A., Huisman, L.G., Pieterman, E.J., Grimbergen, J.M. et al. (2003). Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3. *Gene Ther*, Vol.10, No.3, pp. 234-242, ISSN: 0969-7128
- Varisco, P. A.; Péclat, V., van Ness, K., Bischof-Delaloye, A., So, A. & Busso, N. (2000). Effect of thrombin inhibition on synovial inflammation in antigen induced arthritis. *Ann Rheum Dis*, Vol.59, No.10, pp. 781-787, ISSN: 0003-4967
- Weinberg, J.B.; Phippen, A.M. & Greenberg, C.S. (1991). Extravascular fibrin formation and dissolution in synovial tissues of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol.34, No.8, pp. 996-1005, ISSN: 0004-3591
- Wernicke, D.; Schulze-Westhoff, C., Bräuer, R., Petrow, P., Zacher, J., Gay, S. & Gromnica-Ihle, E. (2002). Stimulation of collagenase 3 expression in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis by contact with a three-dimensional collagen matrix or with normal cartilage when coimplanted in NOD/SCID mice. *Arthritis Rheum*, Vol.46, No.1, pp. 64-74, ISSN: 0004-3591
- Wunrau, C.; Schnaeker, E.M., Frey, K., Pundt, N., Wendholt, D., Neugebauer, K. & et al. (2009). *Arthritis Rheum*, Vol.60, No.9, pp. 2606-2611, ISSN: 0004-3591
- Woessner, J.F.Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, Vol.5, No.8, pp. 2145-2154, ISSN: 0892-6638

- Yamanaka, H.; Makino, K., Takizawa, H., Fujimoto, N., Moriya, H. et al. (2000). Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metralloproteinases in rheumatoid synovium. *Lab Invest*, Vol.80, No.5, pp. 677-687, ISSN: 0023-6837
- Yoshihara, Y.; Nakamura, H., Obata, K., Yamada, H., Hayakawa, T., Fujikawa, K. & Okada, Y. (2000). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, Vol.59, No.6, pp. 455-461, ISSN: 0003-4967



Rheumatoid Arthritis - Etiology, Consequences and Co-Morbidities

Edited by Dr. Andrew Lemmey

ISBN 978-953-307-847-2

Hard cover, 304 pages

Publisher InTech

Published online 11, January, 2012

Published in print edition January, 2012

The purpose of this book is to provide up-to-date, interesting, and thought-provoking perspectives on various aspects of research into current and potential treatments for rheumatoid arthritis (RA). This book features 16 chapters, with contributions from numerous countries (e.g. UK, USA, Japan, Sweden, Spain, Ireland, Poland, Norway), including chapters from internationally recognized leaders in rheumatology research. It is anticipated that Rheumatoid Arthritis - Etiology, Consequences and Co-Morbidities will provide both a useful reference and source of potential areas of investigation for research scientists working in the field of RA and other inflammatory arthropathies.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Olga Sánchez-Pernaute, Antonio Gabucio, Astrid Jüngel, Michel Neidhart, María Comazzi, Gabriel Herrero-Beaumont, Renate E. Gay and Steffen Gay (2012). Innate Mechanisms of Synovitis – Fibrin Deposits Contribute to Invasion, Rheumatoid Arthritis - Etiology, Consequences and Co-Morbidities, Dr. Andrew Lemmey (Ed.), ISBN: 978-953-307-847-2, InTech, Available from:

<http://www.intechopen.com/books/rheumatoid-arthritis-etiology-consequences-and-co-morbidities/innate-mechanisms-of-synovitis-fibrin-deposits-contribute-to-invasion>

INTeCH
open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821